

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften - Dr. rer. nat. –
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Embryonalentwicklung des Zentralkomplexes im Gehirn der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*

vorgelegt von

Michaela Romy Güntner

1. Gutachter: Prof. Dr. George Boyan
2. Gutachter: PD Dr. Martin Heß

München 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. George Boyan (Vorsitz)

2. Gutachter: PD Dr. Martin Heß

Tag der mündlichen Prüfung: 05. März 2015

Embryonalentwicklung des Zentralkomplexes im Gehirn der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Zusammenfassung.....	13
Abstract	16
2 Einleitung.....	19
2.1 Der Zentralkomplex in Insekten	20
2.1.1 Lage und Morphologie des Zentralkomplexes.....	21
2.1.2 Neuronale Organisation des Zentralkomplexes im Gehirn der adulten <i>Schistocerca gregaria</i> ...	23
2.1.3 Funktionen des Zentralkomplexes.....	24
2.1.4 Embryonale und adulte Entwicklung des Zentralkomplexes.....	26
2.2 Kartierung der Neuroblasten im Gehirn von Insekten.....	27
2.3 Neuronale Entwicklung in Insekten.....	29
2.3.1 Allgemeine neuronale Entwicklung und genetische Kontrolle.....	30
2.3.2 Neuronale Stammzellen im Gehirn und deren Entwicklungslinien	32
2.3.3 Pionierneuronen	34
2.3.4 Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Nervensystem von Insekten	35
2.4 Gene und neuroaktive Moleküle im Gehirn von Insekten.....	37
2.4.1 Das Gen <i>engrailed (en)</i>	38
2.4.2 Serotonin (5HT-ICC)	39
2.4.3 Locustatachykinin (<i>LomTK</i>)	39
2.4.4 Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin-Amid (FLRFamid).....	40
2.4.5 Allatostatin (AST)	40
2.4.6 Periviscerokin (PVK) und Pyrokinin (PK)	40
2.5 Das Modelltier <i>Schistocerca gregaria</i>.....	41
3 Zielstellung	45
4 Material und Methoden.....	47
4.1 Forschungsmaterial	47
4.1.1 Tierhaltung.....	47
4.1.2 Zucht der Modelltiere.....	48
4.1.3 Altersbestimmung	48
4.2 Vorbereitung der Präparate.....	48
4.2.1 Präparieren des Untersuchungsmaterials	48
4.2.1.1 Präparieren der Embryonen aus dem Ei	49
4.2.1.2 Präparieren der Larven- und Adultengehirne	49
4.2.2 Einbettungsverfahren und Schnitte.....	49
4.2.2.1 Herstellung von Schnitten mit Eponeinbettung.....	49
4.2.2.2 Herstellung von Schnitten mit Agaroseeinbettung	49
4.2.3 Eindeckeln der Präparate	50
4.3 Immunzytochemische Färbemethoden.....	50
4.3.1 Färbung gegen das Antigen <i>engrailed</i>	51
4.3.2 Färbung gegen den Neuromodulator 5HT-ICC	52
4.3.3 Färbung gegen <i>LomTK</i>	52
4.3.4 Färbung gegen FLRFamid.....	53

4.3.5	Färbung gegen <i>Diploptera punctata</i> -AST.....	53
4.3.6	Färbung gegen PVK und PK.....	54
4.3.7	Färbung gegen HRP.....	54
4.3.8	Färbung gegen Lazarillo	55
4.3.9	Färbung gegen Mes-3	55
4.3.10	Färbung gegen 8B7	55
4.3.11	Doppelfärbungen.....	56
4.4	Histochemische Färbemethoden	57
4.4.1	Wigglesworth Osmiumtetroxid-Ethylgallat-Färbung.....	57
4.4.2	NADPH-Diaphorase Färbung.....	57
4.5	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-bildgebende-Massenspektrometrie (MALDI-IMS)	58
4.6	Gewebekultur und Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einlagerung	59
4.7	Iontophoretische Markierung von Zellen	60
4.8	Imaging	61
4.8.1	Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.....	61
4.8.2	Elektronenmikroskopie.....	62
4.8.3	Konfokalmikroskopie	62
4.8.4	Verwendete Bildverarbeitungsprogramme.....	62
4.9	Neuralachsen	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Neuroarchitektur der w-, x-, y- und z-Trakte des Zentralkomplexes von <i>Schistocerca gregaria</i> ...	65
5.1.1	Neuronale Organisation des Zentralkomplexes in der adulten Heuschrecke	65
5.1.2	Organisation der protocerebralen Neuroblasten im frühen Embryogehirn.....	66
5.1.3	Identifizierte Neuroblasten und ihre Entwicklungslinien im embryonalen Protocerebrum	72
5.1.4	Entwicklung der z-Trakt-bildenden Neuroblastenlinie im Zentralkomplex	75
5.2	Bildung und Herkunft bestimmter Zellen im Mittelgehirn und der primären Kommissur	79
5.2.1	Identifizierte Zellen der dorsalen medianen Domäne während der frühen Embryogenese.....	79
5.2.2	Immunzytochemischer Charakter der LCs in der medianen Domäne	80
5.2.3	Faszikulierung von identifizierten Axonen des primären Faszikels der protocerebralen Kommissur	84
5.2.4	Entwicklung der Lateralen Zellen: Iontophoretische Markierung mit Dil und Lucifer Yellow	85
5.2.5	Entwicklung der Lateralen Zellen: Immunzytochemischer Beweis für den mesektodermalen Ursprung.....	87
5.2.6	Entwicklung der Lateralen Zellen: Zellwanderungen in der dorsalen medianen Domäne des frühen embryonalen Gehirns der Heuschrecke	89
5.3	Expression von Neuromodulatoren in der Entwicklung des Zentralkomplexes	91
5.3.1	Identifikation von Neuromodulatoren im Gehirn durch Massenspektrometrie	91
5.3.2	Expressionsmuster differenter Moleküle im Zentralkomplex in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der <i>Schistocerca gregaria</i>	93
5.3.2.1	LomTK-Immunreaktivität	93
5.3.2.2	Allatostatin-Immunreaktivität.....	96
5.3.2.3	Periviscerokinin / Pyrokinin Immunreaktivität.....	98
5.3.2.4	FLRFamid-Immunreaktivität.....	100
5.3.2.5	Serotonin (5HT-ICC)-Immunreaktivität	101
5.3.2.6	Kolokalisation von 5HT-ICC und anderen Neuropeptiden im Zentralkomplex	104
5.3.2.7	Histologische NADPH-Diaphorase/NO Färbung	104
6	Diskussion	109
6.1	Entwicklung der w-, x-, y-, z-Trakte im embryonalen Gehirn der Heuschrecke <i>Schistocerca gregaria</i>	109
6.1.1	Kartierung der protocerebralen Neuroblasten analog zur Karte des ventralen Bauchmarks ...	111
6.1.2	Entwicklungslinien von Gehirnneuroblasten, die zum Zentralkomplex beitragen.....	116
6.1.3	Entwicklungsalter-Abhängigkeit der Anordnungen der Axonprojektionen der w-, x-, y- und z-Trakte	117

6.2	Entwicklung der Lateralen Zellen und der Pioniere der protocerebralen Kommissur	120
6.2.1	Neuronale Vorläuferzellen im ventralen Bauchmark (VNC)	121
6.2.2	Die mediane Domäne und ihre neuronalen Vorläuferzellen	122
6.2.3	Pioniere der medianen Domäne von <i>Scg</i>	123
6.2.4	Bildung der primären protocerebralen Kommissur	125
6.2.5	Wanderungen der Pionierzellen	127
6.2.6	Weitere Entwicklung der Pionierneuronen	128
6.2.7	Weiterführende Experimente	128
6.3	Neuromodulatorexpression im Zentralkomplex von <i>Schistocerca gregaria</i>	129
6.3.1	Räumliche Expressionsmuster von Peptiden in Abhängigkeit des Entwicklungszeitpunktes	129
6.3.2	Funktionelle Aspekte der Neuromodulatorexpression	132
6.3.3	Die Neuromodulatoren im Einzelnen	133
6.3.3.1	Tachykinin	133
6.3.3.2	Allatostatin	133
6.3.3.3	Periviscerokinin und Pyrokinin (Lom-PVK 1, Lom-PVK 2, Scg-PVK-3, Scg-PK1-7)	134
6.3.3.4	FLRFamid	135
6.3.3.5	Serotonin ein klassischer Transmitter	135
6.3.3.6	Stickstoffmonoxid, ein endogener Botenstoff	136
6.3.3.7	Zusammenfassung der Neuromodulatoren-Expressionsmuster	137
7	Ausblick	139
8	Literaturverzeichnis	141
Anlagen		159
Anlage I		161
	Eidesstattliche Erklärung	163
Anlage II		165
	Danksagung	167
Anlage III		169
	Eigene Veröffentlichungen	170

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lage des komplexen Gehirns von <i>Schistocerca gregaria</i>	20
Abbildung 2:	Zentralkomplex einer adulten <i>Schistocerca gregaria</i>	20
Abbildung 3:	Zentralkomplex von <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Abbildung 4:	Der Zentralkomplex in <i>Schistocerca gregaria</i> (Entwicklung bei 85%). Diaphorase-Färbung mit NO-positiven Zellen in den w-, x-, y- und z-Trakten.....	21
Abbildung 5:	Lokalisation der Pars intercerebralis (Grauzeichnung) im Protocerebrum der Insekten (schematisch)	21
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau des Zentralkomplexes	23
Abbildung 7:	Vergleich der Entwicklung der hemimetabolen <i>Schistocerca gregaria</i> und der holometabolen <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Abbildung 8:	Kartierung der Neuroblasten im Embryonalgehirn (45%) von <i>Schistocerca gregaria</i>	27
Abbildung 9:	Veränderung der Gehirnorientierung im Vergleich zu den Körperachsen im Laufe der Embryogenese von <i>Schistocerca gregaria</i>	28
Abbildung 10:	Schematische Darstellung von verschiedenen Insektennervensystemen	29
Abbildung 11:	Genetische Kontrolle der Gehirnentwicklung bei Insekten	31
Abbildung 12:	Delamination und Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen	33
Abbildung 13:	Axonales Gerüst aus Pionierneuronen in <i>Scg</i>	37
Abbildung 14:	Schematische Zusammenfassung der Expression von Neuromodulatoren im Zentralkomplex im adulten Heuschreckengehirn	38
Abbildung 15:	Schwarm <i>Schistocerca gregaria</i>	42
Abbildung 16:	Solitäre <i>Schistocerca gregaria</i>	42
Abbildung 17:	Gregäre <i>Schistocerca gregaria</i>	42
Abbildung 18:	Kopf eines Heuschreckenembryos bei 27% der Embryonalentwicklung	67
Abbildung 19:	Organisation von protocerebralen Neuroblasten bei 33% der Embryonalentwicklung	69
Abbildung 20:	Organisation von protocerebralen Neuroblasten bei 47% der Embryonalentwicklung	69
Abbildung 21:	3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryogenese. Ventrale Ansicht	71
Abbildung 22:	3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryogenese. Anteriore Ansicht	71
Abbildung 23:	3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryonalentwicklung. Mediale Ansicht	71
Abbildung 24:	Identifizierte Neuroblasten und ihre Entwicklungslinien	72
Abbildung 25:	Wigglesworth-Färbung der Entwicklungslinie des Neuroblasten 7-1	73
Abbildung 26:	BrdU-Einlagerung im PC bei 33% der Embryogenese	73
Abbildung 27:	Intrazelluläre Injektion des Neuroblasten 7-1 mit Lucifer Yellow	73
Abbildung 28:	Computer-generiertes 3D-Modell der an der Bildung der w-, x-, y- und z-Trakte beteiligten protocerebralen Neuroblasten. Ventrale Ansicht	74
Abbildung 29:	Computer-generiertes 3D-Modell der an der Bildung der w-, x-, y- und z-Trakte beteiligten protocerebralen Neuroblasten. Sagittale Ansicht	74
Abbildung 30:	Entwicklungslinie der Z-Zellgruppe des Zentralkomplexes aus einer Rekonstruktion serieller Schnitte	76
Abbildung 31:	Zeitliche Topologie der axonalen Projektionen in einem Trakt des Zentralkomplexes	77
Abbildung 32:	Zellgruppen W, X, Y, Z des adulten Zentralkomplexes	78
Abbildung 33:	Lage der PCP- und LC-Zellen	79
Abbildung 34:	Immunzytochemische Färbungen gegen HRP und Doppelfärbungen mit Laz und Mes-3	82
Abbildung 35:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines parasagittalen Gehirnschnittes	84
Abbildung 36:	Iontophoretische Markierung mit Dil und LuY in Lateralen Zellen	86
Abbildung 37:	Mesektodermaler Ursprung von Lateralen Zellen und Pionieren der proto cerebralen Kommissur in der medianen Domäne des Heuschreckengehirns	87

Abbildung 38:	Zellwanderungen in der dorsalen medianen Domäne bei 34% der Embryogenese. Wigglesworth-Färbung	89
Abbildung 39:	Spektrum der Neuropeptide des Zentralkörpers mit einem Gewicht von 800 bis 1500 Dalton aus Gehirnschnitten der Heuschrecke <i>Schistocerca gregaria</i>	91
Abbildung 40:	Expressionsmuster von <i>LomTK I</i> und <i>LomTK II</i> im adulten Heuschreckengehirn	92
Abbildung 41:	Konfokalbilder der <i>LomTK</i> -Immunreaktivität	94
Abbildung 42:	Konfokalbilder der Allatostatin-Immunreaktivität	97
Abbildung 43:	Konfokalbilder der PVK/PK-Immunreaktivität	99
Abbildung 44:	Konfokalbilder der FLRFamid-Immunreaktivität	101
Abbildung 45:	Konfokalbilder der 5HT-ICC-Immunreaktivität	103
Abbildung 46:	Konfokalbilder von Doppelfärbungen im dritten Larvalstadium	104
Abbildung 47:	Mikroskopische Aufnahmen der Expressionsmuster von NADPHd	106
Abbildung 48:	Genexpressionensmuster von Neuroblasten und deren Nachkommen im Bauchmark von <i>Drosophila</i> und <i>Schistocerca</i>	113
Abbildung 49:	Vergleich räumliche Verteilung der Gehirnneuroblasten in fünf Insektenarten	115
Abbildung 50:	Vergleich der Neuroblasten, die zu den Trakten des Zentralkomplexes beitragen, bei fünf Insektenarten	116
Abbildung 51:	Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen NSC Typ II in <i>Drosophila</i>	118
Abbildung 52:	Entwicklungsrichtung der INPs in einem schematisch abgebildeten Trakt des Zentralkomplexes	119
Abbildung 53:	Modulare Basis der Traktentwicklung im Zentralkomplex	120
Abbildung 54:	Entwicklung der primären protocerebralen Kommissur (schematisch)	125
Abbildung 55:	Chiasmabildung des Zentralkomplexes durch Faszikelwechsel in <i>Schistocerca gregaria</i>	126
Abbildung 56:	Schematische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener Neuromodulatoren	132
Abbildung 57:	NO, ein Gas als Neuromodulator	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Immunzytochemie, Einzelfärbungen	50
Tabelle 2:	Immunzytochemie, Einzelfärbungen und Doppelfärbungen, 2. Antikörper	51
Tabelle 3:	Immunzytochemie, Doppelfärbungen	56
Tabelle 4:	Iontophoretische Markierung	61
Tabelle 5:	Anregungswellenlängen der sekundären Antikörper	62
Tabelle 6:	Zuordnung der Neuroblasten des Protocerebrums in Reihen und ihre Bezeichnungen	70
Tabelle 7:	Neuropeptide des Zentralkomplexes aus den Familien: Tachykinine, Allatostatine, FLRFamide, PK/PVK und Neuropeptid F	92

Abkürzungsverzeichnis

1L	erstes Larvalstadium
3D	dreidimensional
5HT, 5HT-ICC	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin interstitielle Cajal-Zelle, 5-Hydroxytryptamin interstitial cells of Cajal
4D9	Antikörper gegen Engrailed
8B7	Antikörper gegen die Akt2-Isoform der Proteinkinase B
10E6	Antikörper gegen Lazarillo
A , a	anterior
Ac	anteriore Kommissur, anterior commissure
ACIII	dritte anteriore Kommissur, third anterior commissure
aFG	Anlage des Frontalganglions
AK	Antikörper
AL, aL	antennaler Lobus
An	Antenne
AOTu	Anteriores optisches Tuberkel
ASC	Allatostatinexprimierendes kolumnares Neuron, allatostatin expressing columnar neuron
ASC 1	Allatostatinzelle Typ 1, allatostatin cell type 1
ASC 2	Allatostatinzelle Typ 2, allatostatin cell type 2
AST	Allatostatin
BM , bm	Basalmembran
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>btd</i>	<i>buttonhead</i>
Ca	Calyx des Pilzkörpers
Caln	Calmodulin
CB	Zentralkörper, central body
CC	Zentralkomplex, central complex
CCAP	krebstierartiges kardioaktives Peptid, crustacean cardioactive peptide
CCD	ladungsgekoppeltes Element (Kamera), Charge-coupled Device
cGMP	zyklisches Guanosin-Mono-Phosphat
CHCA	α -cyano-4-hydroxymizsäure
Cl	Clypeolabrum
CL	Kolumnares Neuron, columnar neuron
CNS	zentrales Nervensystem, central nerve system
coc	circumoesophageales Konnektiv, circumoesophageal connective

com	Kommissur, commissure
CX	Zentralkomplex, central complex
D, d	dorsal
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DAB	Diaminobenzidin
DC	Deutocerebrum
DiI	Diiodadecyltetramethylindocarbocyanin
<i>Dip</i>	<i>Diploptera punctata</i>
DM	Neuroblasten von <i>Drosophila melanogaster</i>
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EB	ellipsoider Körper, ellipsoid body
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors, epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EH	Schlüpfhormon, eclosion hormone
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren, enzyme-linked immunoadsorbent assay
<i>ems</i>	<i>empty spiracles</i>
En, <i>en</i>	<i>engrailed</i>
FA	Formaldehyd
FCS	Fetales Kälberserum, fetal calf serum
FG, fg	Frontalganglion
FLRFamid	Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin-Amid
FMRFamid	Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin-Amid
GABA	γ -Aminobuttersäure, γ -aminobutyric acid
GAM	Ziege-gegen-Maus, goat-anti-mouse
GAM-Cy3	Antikörper goat-anti-mouse gekoppelt mit Zytocrom-3
GAM-FITC	Antikörper goat-anti-mouse gekoppelt mit Fluoresceinisothiocyanat
GAM-PO	Antikörper goat-anti-mouse gekoppelt mit Peroxidase
GAR	Ziege-gegen-Kaninchen, goat-anti-rabbit
GAR-Alexa-488	Antikörper goat-anti-rabbit gekoppelt mit Alexa-488
GAR-FITC	Antikörper goat-anti-rabbit gekoppelt mit Fluoresceinisothiocyanat
GAR-TRITC	Antikörper goat-anti-rabbit gekoppelt mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat
GMC	Ganglionmutterzelle, ganglion mother cell
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GS	Glutamin-Synthetase

HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase
INP	intermediäre neurale Vorläuferzelle, intermediate neural progenitor,
L, l	lateral
L1	erstes Larvalstadium
L3	drittes Larvalstadium
LAL	lateral akzessorischer Lobus
Laz	Lazarillo
Lb	Labrum
LC	Laterale Zelle, lateral cell
LOc	lateral Ocellus
<i>Lom</i>	<i>Locusta migratoria</i>
<i>LomTK</i>	<i>Locusta migratoria</i> -Tachykinin
IPC	laterales Protocerebrum
<i>l'sc</i>	<i>lethal of scute, single-minded</i>
LT	<i>LomTK</i> -exprimierendes Neuron
LTC	<i>LomTK</i> -exprimierendes kolumnares Neuron, <i>LomTK</i> expressing columnar neuron
LTT	<i>LomTK</i> -exprimierendes tangential Neuron
LuY	Lucifer Yellow
M, m	median
Ma	Mandibel
Mab	monoklonaler Antikörper, monoclonal antibody
MAL	medianer akzessorischer Lobus
MALDI-IMS	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-bildgebende Massenspektrometrie, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie mit Flugzeit-Analyse, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight
Mes-3	Methylesterase
mb, Mb	Pilzkörper, mushroom body
Md	Mandibel
MD	mediane Domäne
MEc	Mesektoderm, mesectoderm
MI, mid	Mittellinie, midline
mocnr	Nervenfasern des medianen Ocellus, median ocellar nerve root
MP	mediane Vorläuferzelle, Mittellinienvorläuferzelle, median precursor

MPp	Nachkommen der Mittellinienvorläuferzelle, progenitor of the median precursor
mPC	medianes Protocerebrum
MT-2	Metallothioneinrezeptor-2
N	Noduli
NADPHd	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Diaphorase
NB, Nb	Neuroblast
NEc	Neuroektoderm, neuroectoderm
NGF	Nervenwachstumsfaktor, nerve growth factor
NGS	normales Ziegenserum, normal goat serum
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSC	neurale Stammzelle, neuronale Vorläuferzelle, neural stem cell
nuc	Nukleus, nucleus
Oe	Oesophagus
OL	optischer Lobus
OLa	Anlage optischer Lobus
OT	optischer Trakt
<i>otd</i>	<i>orthodenticle</i>
P, p	posterior
PB	protocerebrale Brücke
PBS	phosphatgepufferte Saline, phosphate buffered saline
PBT	Gemisch aus PBS und Triton X-100
pc	posteriore Kommissur, posterior commissure
PC	Protocerebrum
PCC	Protocerebrale Kommissur, protocerebral commissure
PCP	Primärer Pionier der protocerebralen Kommissur, primary pioneer of the protocerebral commissure
<i>Pea</i>	<i>Periplaneta americana</i>
pG	posteriore Furche, posterior groove
Ph	Pharynx
PI	Pars intercerebralis
PIPES	Piperazinethansulfonsäure
PK	Pyrokinin
PSD	Proteine der „postsynaptischen Dichte“
PVK	Periviscerokinin
RNS	Ribonukleinsäure

S	Serotonin, exprimierende Zellen
S1	Segment 1. Mandibulares Segment. Neuroblastenstadium 1
S2	Segment 2. Neuroblastenstadium 2
S3	Neuroblastenstadium 3
S4	Neuroblastenstadium 4
Scg	<i>Schistocerca gregaria</i>
SCN	sekundärer Pionier der protocerebralen Kommissur secondary commissure neuron
sim	<i>single-minded</i>
SPF	<i>Schistocerca gregaria</i> -Neuropeptid F
stom	Stomodum
TB	tangentiale Neuronen der protocerebralen Brücke
TC	Tritocerebrum
TK	Tachykinin
TL	tangentiale Neuronen
tll	<i>tailless</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UMI	unpaares medianes Interneuron, unpaired median interneuron
UV	Ultraviolett
V, v	ventral
VUM	ventrales unpaares medianes Neuron, ventral unpaired median neuron
WT	Wildtyp
W, X, Y, Z	Neuroblasten der Trakte des Zentralkomplexes
w, x, y, z	Trakte des Zentralkomplexes
w, x, y, z	Abstammungen (lineages) der Trakte des Zentralkomplexes
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Embryonalentwicklung des Zentralkomplexes im Gehirn der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Scg). Der Zentralkomplex besteht aus der protocerebralen Brücke (PB), dem ellipsoiden Körper (EB) und dem Zentralkörper (CB), den gepaarten Noduli (N) und den lateralen akzessorischen Loben (LAL). Er befindet sich wie bei allen untersuchten Insekten im Mittelgehirn im Protocerebrum und ist modular aufgebaut. Auffällig sind die *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte zwischen der protocerebralen Brücke und dem Zentralkörper sowie die Überkreuzungen der Kolumnen. Diese Chiasmen liegen, bezogen auf die Neuralachsen, unmittelbar anterior bzw. posterior des Zentralkörpers zwischen den einzelnen Teilen des Zentralkomplexes. Funktionen des Zentralkomplexes sind unter anderem die Verarbeitung von polarisiertem Licht, die Integration verschiedener Sinneseindrücke, z.B. visuelle und olfaktorische, die Lauterzeugung und die lokomotorische Steuerung der Beine und Antennen. Der Zentralkomplex wird wie die Pilzkörper außerdem als ein möglicher Sitz des Ortsgedächtnisses angesehen.

Die Entwicklung der auffälligen *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte des Zentralkomplexes der Heuschrecke ist Gegenstand des ersten Abschnitts der Arbeit. Da das Protocerebrum als Ursprungsort der Entwicklung des Zentralkomplexes angesehen wird, wird dazu eine neue topologische Neuroblastenkarte dieses Gehirnteils mit Hilfe von Expressionsmustern, wie z.B. des Proteins des Segmentpolaritätsgens *engrailed*, erstellt.

Je Protocerebrumhälfte entstehen 95 neuronale Stammzellen, die Neuroblasten (NBs), in einem stereotypen Muster. Die NBs sind, wie in den thorakalen und abdominalen Segmenten, in sieben Reihen angeordnet und werden nach ihrer Reihe und ihrer Position in der jeweiligen Reihe bezeichnet. Es gibt jedoch für verschiedene NBs zusätzliche Benennungen mit Großbuchstaben. Vier dieser 95 Neuroblasten, 1-1 entspricht W, 2-1 entspricht X, 3-1 entspricht Y und 4-1 entspricht Z, sind die Vorläuferzellen für vier Zellcluster, die je Gehirnhemisphäre jeweils einen Trakt des Zentralkomplexes bilden. Zur Vereinfachung werden die am Zentralkomplex beteiligten NBs sowohl mit Ziffern als auch mit Buchstaben benannt. Es wird die Entwicklung des *z*-Traktes aus dem NB 4-1 (Z) beschrieben. Die Entwicklung erfolgt in Abhängigkeit des Alters der Neuroblasten und ihrer Nachkommenzellen, damit zeigt sich ein altersabhängiges Entwicklungsmodell. Die Trakte *w*, *x* und *y* entwickeln sich morphologisch analog zu Trakt *z*.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wird die Embryonalentwicklung von identifizierten Zellen in der medianen Domäne des Mittelhirns der Heuschrecke beschrieben. Es handelt sich um die Lateralen Zellen (LCs), die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur (PCPs) und die sekundären Pioniere der Kommissur (SCNs). Die genannten Pionierzellen sind Meerrettichperoxidase (HRP)-positiv und damit Neuronen. Sie bilden gemeinsam die erste Verbindung zwischen den beiden Gehirnhemisphären in der Heuschrecke und tragen zu einem axonalem Gerüst bei, welches als Leitstruktur für die Pionierzellen der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte aus der Pars intercerebralis in das Mittelhirn dient. Die Lateralen Zellen sind unpaar in der lateralen medianen Domäne (MD) an der Grenze zu den protocerebralen Hemisphären positioniert. Zusätzlich zur HRP-Expression können sie durch ihre Expression des Lipocalin Lazarillo identifiziert werden. Die PCPs der MD bilden Wachstumskegel, die Filopodien in Richtung Gehirnmittellinie ausbilden. Diese Filopodien faszikulieren miteinander und damit entsteht die erste axonale Verbindung über die Gehirnmittellinie hinweg. Die SCNs differenzieren lateral zur MD in jeder Hirnhemisphäre. Die HRP-Färbung zeigt, dass die SCNs Neuronen sind und mit ihren Fortsätzen über die Gehirnmittellinie wachsen. Dort faszikulieren sie miteinander. Die Axone der LCs differenzieren Richtung PCPs und später Richtung SCNs. Die SCN jeder Gehirnseite faszikuliert zuerst mit der LC derselben Seite und anschließend mit den Axonen der PCPs. Gemeinsam bilden die drei genannten Zelltypen auf diese Weise die erste protocerebrale Kommissur. Mit verschiedenen Färbemethoden, Immunzytochemie, histologischen und mikroskopischen Methoden, wie der Elektronen-, Konfokal-, Fluoreszenz- und Interferenzkontrastmikroskopie, werden die LCs und die PCPs der protocerebralen Kommissur charakterisiert, die, wie beschrieben, ein axonales Grundgerüst zur Orientierung verschiedener Neuropile, wie z.B. den Zentralkomplex, bilden. LCs und PCPs exprimieren neben HRP auch Mes-3, die SCNs dagegen nur HRP. Mes-3-Expression beweist den mesektodermalen Ursprung der LCs und PCPs. Es wird ein Modell der Bildung dieser Zellen von ihrer Delamination, über ihre Wanderung zu ihren endgültigen Zielen im Gehirn und ihrer weiteren Entwicklung beschrieben.

Schließlich werden im dritten Abschnitt die embryonalen und postembryonalen Expressionsmuster von verschiedenen Neuromodulatoren und die Lokalisation von Botenstoffen anhand der Markierung des zu ihrer Bildung benötigten Enzyms im Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria* erstmals beschrieben. Anschließend erfolgt ein Vergleich der gefundenen Muster mit den adulten Mustern. Die Weiterentwicklung der Massenspektrometrie durch Crecelius et al. (2005), die Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-bildgebende Massenspektrometrie (MALDI-IMS), ermöglicht es

Vertreter verschiedener Peptidfamilien zum ersten Mal auf einzelnen Gehirnschnitten zu identifizieren: Tachykinine, Allatostatine, Periviscerokine, Pyrokinine, Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin-Amide (FLRFamid) und das Neuropeptid F. Nachfolgend werden mit immunzytochemischen und histologischen Methoden die Embryonalentwicklungen der Peptidexpressionsmuster beschrieben. Abschließend wird das Entwicklungsmuster des endogenen Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO) über sein zur Bildung benötigtes Enzym Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Diaphorase (NADPHd) und das Muster des Indolamins Serotonin dargestellt. Zusammengefasst lässt sich sagen, die Expression folgender Peptide beginnt bei:

- 50% der Embryogenese Tachykinin
- 65% der Embryogenese Allatostatin
- 70% der Embryogenese NADPHd
- 75% der Embryogenese das biogene Amin Serotonin.

Erst später in der Embryonalentwicklung zeigen sich Periviscerokinin und FLRFamid in einzelnen Neuronen des Zentralkomplexes. Ihr komplettes Muster entwickelt sich postembryonal. Zuerst sind die Peptide in den tangentialen Neuronen des Zentralkörpers nachweisbar und später in den Kolumnaren. Die Neuromodulatoren zeigen ihre Expression in verschiedenen Schichten des Zentralkörpers. Diese Beobachtung deutet auf verschiedene Funktionen der untersuchten Neuromodulatoren und Botenstoffe hin. Für die genannten Neuromodulatoren und Botenstoffe wurden bereits Funktionen in der Entwicklung von Insektennervensystemen beschrieben und als Grundlage für die Funktionen des adulten Zentralkomplexes erkannt. Die Erkenntnisse über die einzelnen Funktionen müssen in weiteren Studien vertieft werden.

Abstract

The central complex is a major neuropil in the protocerebral midbrain of insects. It is involved in multimodal information processing (polarized light, olfaction, etc.), in coordinating motor behaviour (such as locomotion, sound production), and in spatial orientation.

Its modular neuroarchitecture is highly organized, and in hemimetabolous insects like the grasshopper it is composed of the following parts: protocerebral bridge (PB), ellipsoid (EB) and central body (CB), paired noduli (N) and the lateral accessory lobes (LAL). A prominent feature in the central complex is the *w*-, *x*-, *y*- and *z*-tract system in which axons project from neuronal clusters in the pars intercerebralis (PI) via the protocerebral bridge to the central body. Also prominent are the chiasms of the columns directly anterior and posterior to the central body between the parts of the central complex.

This study examines cellular and molecular aspects of the embryonic development of the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*.

First, the development of the modular *w*-, *x*-, *y*- and *z*-tracts of the central body in the grasshopper is examined. A new topological map of neuroblast distributions in the protocerebrum in which the central complex is developing is created using the expression pattern of genes like the segment polarity gene *engrailed*. In each hemisphere 95 neuronal stem cells, the so-called neuroblasts (NBs), delaminate from the epithelium and appear arranged in seven rows like in the thoracic and abdominal segments. NBs are named according to their row-number and position in the row or with letters. Four of the 95 neuroblasts namely 1-1 (also known as W), 2-1 (also known as X), 3-1 (also known as Y), 4-1 (also known as Z) generate cell clusters whose neurons give rise to one of the four *w*-, *x*-, *y*-, *z*-tracts respectively. Since all the tracts develop in an analogous manner, the development of the *z*-tract was selected as being representative and is investigated at the single cell level.

Second, the embryonic development of identified cells in the median domain (MD) of the midbrain of the grasshopper is investigated using immunohistochemistry, histology, and dye labeling coupled with confocal, fluorescence- and interference-contrast microscopy. The so-called lateral cells occur singly and are positioned in the MD at the border to the protocerebral hemispheres. They can be identified through their co-expression of the neuronal label HRP, the mesectodermal label Mes-3, and the cell surface lipocalin Lazarillo. Further, the

development of other HRP-/Mes-3-expressing pioneers of the protocerebral commissure (PCPs) is described. The axons of the LCs and the PCPs fasciculate with one another and together with a third set of pioneers, the HRP-positive secondary commissure pioneers (SCNs), build an axonal scaffold on which other neuropils orientate during their development. A model describes their delamination, migration to their target positions in the midbrain, and subsequent development.

Third, the embryonic development of expression patterns of different neuromodulators are studied for the first time. With the newly developed matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI-IMS) technique (Crecelius et al., 2005) it is possible to analyse peptide expression in individual brain slices for the first time. Several neuromodulators belonging to the following peptide families were found: tachykinin, allatostatin, periviscerokinin, pyrokinin, FLRFamide and neuropeptide F. The developing expression patterns of these peptides, as well as of the indolamine serotonin and the endogenous messenger nitric oxide (NO) via its NO-synthesizing enzyme diaphorase (NADPHd) are described. Tachykinin is first seen in central complex neurons at 50% of embryonic development, allatostatin at 65%, NADPHd at 70% and serotonin at 75%. Later in the embryonic development single neurons show periviscerokinin and FLRFamide expression. The whole expression pattern is developing postembryonically. Expression is seen in tangential neurons first and later in columnar neurons of the central complex. The neuromodulators are expressed in different layers of the central body consistent with these layers having different functions in behavior. Some functions of the different neuromodulators and messengers in the development of nervous systems and in the adult central complex are known. To get a deeper understanding further studies are necessary.

2 Einleitung

Zur Erforschung von verschiedenen Entwicklungsprozessen wurden in den letzten Jahrzehnten oftmals Spezies aus dem Tierstamm der Arthropoda als Modellsystem gewählt, z.B. bei der Untersuchung der embryonalen Musterbildung (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980) und der Neuronenentwicklung aus Vorläuferzellen (Review: Boyan und Reichert, 2011). Neue Techniken und Methoden erlauben Untersuchungen auf Einzelzellniveau und vergleichende Studien. Diese deuten auf funktionelle sowie molekulare Gemeinsamkeiten zwischen Hirnregionen bei Arthropoden und Vertebraten hin (Tomer et al., 2010; Strausfeld und Hirth, 2013). Zudem sind viele grundlegende neuronale Entwicklungsmechanismen zwischen Vertebraten und Invertebraten vergleichbar (Leise, 1990; Reichert und Boyan, 1997; Farris, 2005, 2008, 2011; Tomer et al., 2010; Boyan und Reichert, 2011; Strausfeld und Hirth, 2013).

Der Zentralkomplex ist ein höchst strukturiertes Neuropil im Mittelgehirn aller bekannten Insekten (vgl. Strausfeld, 2012). Dieses hochkomplexe Nervengewebe steuert vielfältige Funktionen in allen Lebensstadien und verschiedene Verhaltensweisen der larvalen und adulten Wüstenheuschrecke. Zum Beispiel ist dieses Neuropil am Schlüpfen und Häuten beteiligt (Stay und Tobe, 2007) und bei der Ernährungsumstellung von Eidotter auf pflanzliche Nahrung (Predel und Wegener, 2006). Um den umfangreichen Aufgaben in der larvalen und adulten Heuschrecke nachkommen zu können, muss der Zentralkomplex bereits embryonal vollständig ausgebildet worden sein. Ausgehend von bereits identifizierten Zellen soll in dieser Arbeit folgendes untersucht werden:

- die Entwicklung einzelner beteiligter neuronaler Stammzellen (Neuroblasten) und deren Entwicklungslinien
- die embryonale Entwicklung der Lateralen Zellen und der Pioniere der protocerebralen Kommissur. Diese Zellen sind an der Bildung eines axonalen Grundgerüsts beteiligt. Das Gerüst dient in der späteren Entwicklung verschiedenen Neuropilen wie dem Zentralkomplex und den Pilzkörpern als Leitstruktur.
- die Entwicklungsmuster von wichtigen Botenstoffen und Neuromodulatoren in der embryonalen, larvalen und der adulten Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*.

2.1 Der Zentralkomplex in Insekten

Der Zentralkomplex ist neben den Pilzkörpern eines der größten Neuropile im Gehirn von Insekten (vgl. Strausfeld, 2012) und zeigt einen komplexen Aufbau (Abbildung 1 und 2). Der Bauplan ist in allen bereits untersuchten Insekten (z.B. Orthoptera, Diptera) hochkonserviert (vgl. Strausfeld, 2012). Abbildung 2 und 3 zeigen den Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria* und *Drosophila melanogaster*. Der Zentralkomplex befindet sich zentral im Protocerebrum und wird lateral von den benachbarten Pilzkörpern (MB) umgeben (Abbildung 1, Abbildung 2).

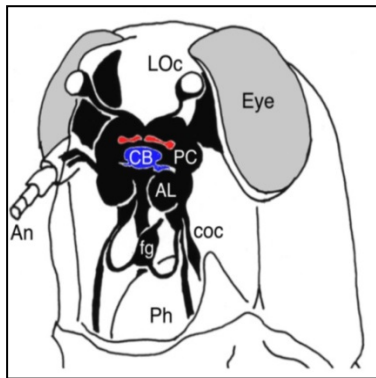


Abbildung 1: Lage des komplexen Gehirns von *Schistocerca gregaria* (rot und blau: Zentralkomplex).
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110.

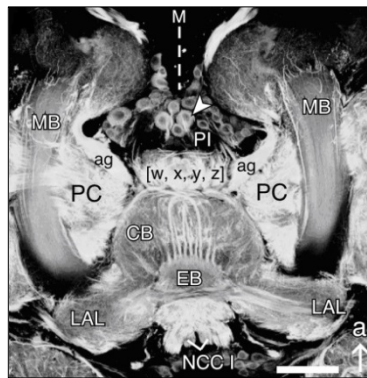


Abbildung 2: Zentralkomplex einer adulten *Schistocerca gregaria*. 8B7 Immunfärbung.
Maßstab: 170µm.
Quelle: Boyan, Williams (2011).
Arthropod Struct Dev 40, 334-348.

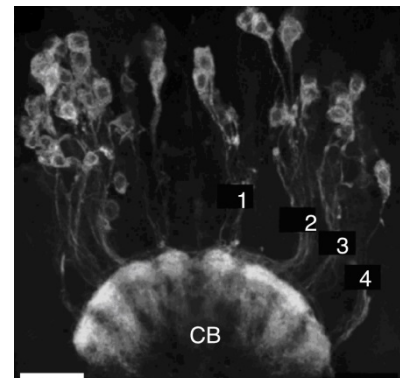


Abbildung 3: Zentralkomplex von *Drosophila melanogaster*, 24 Stunden nach Beginn der Verpuppung. *Drosophila* N-Cadherin-Färbung.
Maßstab: 25µm.
Quelle: Boyan, Williams (2011).
Arthropod Struct Dev 40, 334-348.

Abkürzungen in Abbildung 1:

LOf lateraler Ocellus.
CB Zentralkörper.
PC Protocerebrum.
AL antennaler Lobus.
An Antenne.
fg Frontalganglion.
Ph Pharynx.
coc circumoesophageales
Konnektiv.

Abkürzungen in Abbildung 2:

CB Zentralkörper.
EB ellipsoider Körper.
LAL lateraler akzessorischer
Lobus.
w, x, y, z Trakte w, x, y, z.
MB Pilzkörper.
PC Protocerebrum.
PI Pars intercerebralis.
ag antennen-glomerulärer Trakt.
NCCI Corporis Cardiaci Nerv I.
M Gehirnmittellinie. a anterior.

Erklärungen zu Abbildung 2:

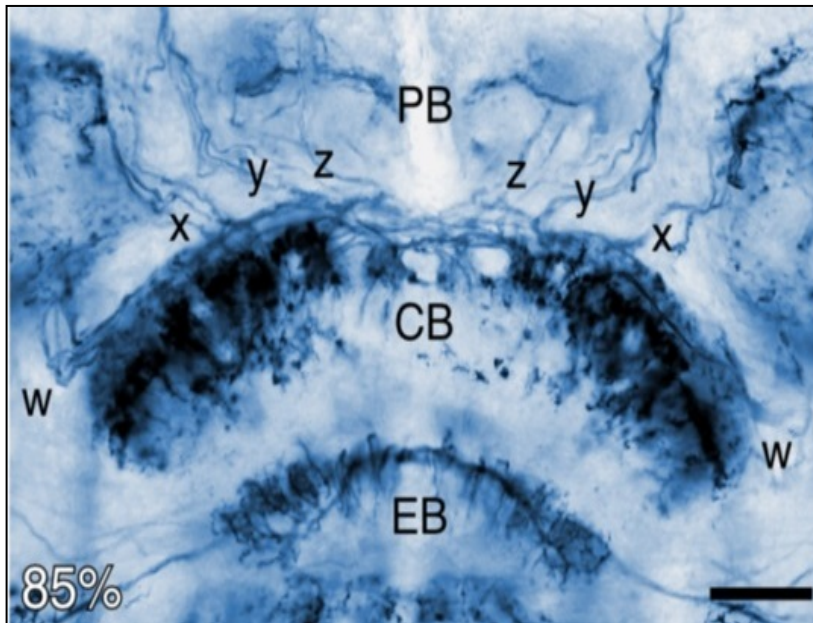
▬ Gehirnmittellinie.
▶ Neuronenzellkörper der Pars
intercerebralis.
↑ anterior.

Abkürzungen in Abbildung 3:

CB Zentralkörper.
1, 2, 3, 4 Fasern pontiner Neuronen.

2.1.1 Lage und Morphologie des Zentralkomplexes

Der Zentralkomplex besteht aus der protocerebralen Brücke, dem ellipsoiden Körper, dem Zentralkörper, den gepaarten Noduli und den lateralen akzessorischen Loben. Auffällig sind seine horizontalen Ebenen und vertikalen Trakte. In hemimetabolen Insekten wie der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* ist der Aufbau des Zentralkomplexes bereits in der embryonalen Entwicklung sichtbar (Abbildung 4).



Hinweise zur Abbildung 4:

Diaphorase-Färbung mit NO-positiven Zellen in den w-, x-, y- und z-Trakten.

Abkürzungen in Abbildung 4:

PB Protocerebrale Brücke.

CB Zentralkörper.

EB ellipsoider Körper.

w, x, y, z Trakte w, x, y, z.

Abbildung 4: Der Zentralkomplex in *Schistocerca gregaria* (Entwicklung bei 85%). Diaphorase-Färbung mit NO-positiven Zellen in den w-, x-, y- und z-Trakten. Maßstab: 25µm. Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110.

Der Zentralkomplex befindet sich im Bereich der Pars intercerebralis. Die PI wurde zum ersten Mal 1905 von Haller bei Hornissen und Schaben beschrieben. Die Region der PI (Graubereich Abbildung 5) befindet sich im Bereich der Mittellinie zwischen den Pilzkörpern

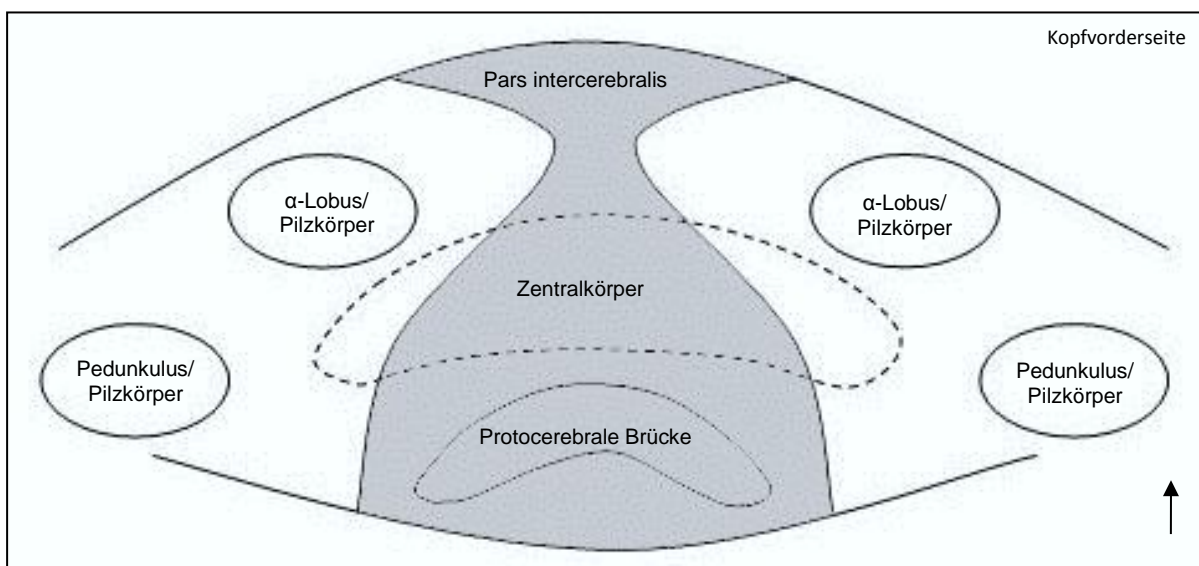


Abbildung 5: Lokalisation der Pars intercerebralis (Grauzeichnung) im Protocerebrum der Insekten (schematisch). Blickrichtung von oben auf den Kopf.

und antero-ventral des Zentralkomplexes (Abbildung 5). Es wird vermutet, dass der Entwicklungsursprung des Zentralkomplexes im Bereich der PI liegt. Dies soll in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden.

Die PI-Zellen wurden von Weyer 1935 bei *Apis mellifica* wegen ihres drüsenähnlichen Aussehens als mediane neurosekretorische Zellen bezeichnet. Morphologisch kann die PI nicht exakt beschrieben werden, da sie übergangslos in alle Richtungen in andere Zellbereiche übergeht. Die Zellkörper der Pars intercerebralis sind protocerebralen Ursprungs, sind heterogen und haben entsprechend der jeweiligen Zugehörigkeiten zu neuronalen Strukturen verschiedene Funktionen. Untersuchungen ergaben, dass in allen bisher beschriebenen Insektengehirnen vergleichbare Gehirnregionen zu finden sind (Rowell, 1976; Raabe, 1989; Strausfeld, 2012).

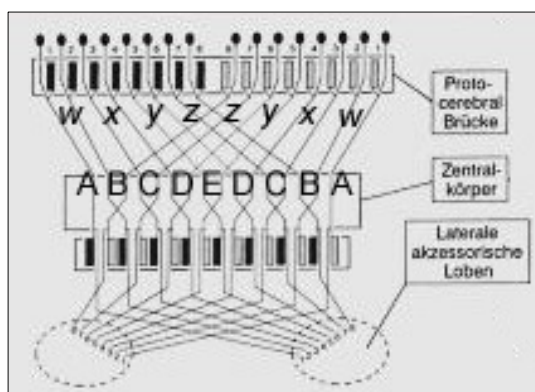
In der Pars intercerebralis befindet sich eine Ansammlung von neurosekretorischen Zellen (Scg: Ludwig et al., 2001). Andere Zellen, wie die primären Pioniere der Kommissur und die Nachkommenzellen der medianen Vorläuferzelle (Scg: Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999, 2002) sind ebenfalls in der Pars intercerebralis zu lokalisieren. Die Zellen entstammen vermutlich aus verschiedenen Keimanlagen, so z.B. die primären Pioniere der Kommissur und die Lateralen Zellen aus dem Mesektoderm (Ludwig et al., 1999, 2000), die sekundären Pioniere der Kommissur aus dem Neuroektoderm (Boyan et al., 1995a). Die jeweilige Zugehörigkeit zu den Keimanlagen soll für die genannten Zellen bewiesen werden.

Allgemein enthalten neurosekretorische Zellen Neuropeptide, aber auch klassische Neurotransmitter wie biogene Amine (z.B. Serotonin, Dopamin). Sekretorische Axonendigungen geben diese Neuromodulatoren in das umliegende Gewebe ab. Durch die Ansammlung von neurosekretorischen Zellen mit ihren Endigungen werden an spezifischen Stellen des Gehirns neurohämale Organe wie die Corpora cardiaca und die Corpora allata in Insekten gebildet, die dem retrocerebralen Komplex zugeordnet werden (Raabe, 1989). Die Ultrastruktur der neurosekretorischen Zellen in der PI wurde bereits von Schooneveld (1974) in *Leptinotarsa decemlineata* beschrieben. Er unterscheidet anhand ihrer Größe, Ultrastruktur, Anzahl der neurosekretorischen Partikel und ihrer unterschiedlichen Funktionen sieben Typen. Sie werden als A, A₁, B, C, E, L und L_B bezeichnet. So zeigt z.B. der A₁-Typ ultrastrukturelle Unterschiede während der aktiven Reproduktionsphase und der eher inaktiven Diapausenphase, der B-Typ eine hohe Aktivität während der Ecdysis. Damit spiegelt die Morphologie die jeweilige Funktion der neurosekretorischen Zellen wider.

Funktionen der neurosekretorischen Zellen der PI sind z.B. die Herstellung und Ausschüttung des Schlüpfhormons „eclosion hormone“ in die Hämolymphe (Copenhaver und Truman, 1986) und anderer Neuromodulatoren wie z.B. Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin (FMRF)-Amid (Homberg et al., 1991a, b) und *Locusta migratoria* (Lom)-Tachykinin (TK) (Nässel, 1993b). Über die Funktionen anderer Zellen, die sich ebenfalls in der PI befinden, ist nur wenig bekannt. In der Literatur werden die medianen neurosekretorischen Zellen und die PI teilweise gleichgesetzt (*Manduca sexta*: Carrow et al., 1984; *Diploptera punctata*: Chiang et al., 1999), die Pars intercerebralis wird jedoch nicht ausschließlich aus neurosekretorischen Zellen gebildet, sondern z.B. auch aus Glia und Neuronen.

2.1.2 Neuronale Organisation des Zentralkomplexes im Gehirn der adulten *Schistocerca gregaria*

Die protocerebrale Brücke liegt an der dorsalen Grenze des Protocerebrums und überquert in gebogener Form die Mittellinie des Gehirns. Wie der ellipsoide Körper und der Zentralkörper ist die PB vertikal segmentiert (Williams, 1975; Homberg, 1991). Die Brücke besteht aus querlaufenden Dendriten und je Gehirnhälfte aus acht Axonbündeln, von denen vier auf derselben Gehirnseite verbleiben und vier in die kontralaterale Gehirnseite projizieren. Damit innervieren sie den Zentralkörper (Williams, 1975). Je zwei Bündel aus verschiedenen Hemisphären faszikulieren zu den Trakten w, x, y und z. Somit werden aus sechzehn Nervenfaserbündeln acht. Im Zentralkörper werden aus Nervenbündeln der Trakte die neun Spalten A, B, C, D, E, D, C, B, A (Nomenklatur: Williams, 1972, 1975) gebildet, die aus Fasern der w-, x-, y- und z-Trakte bestehen: A jeweils aus w, B jeweils aus w/z, C jeweils aus x/z, D jeweils aus x/y und E aus y/y. Unterhalb des Zentralkörpers überkreuzen sich die Faszikel erneut und innervieren die lateralen akzessorischen Loben (Abbildung 6).



Erklärungen zu Abbildung 6:

w, x, y, z Trakte.

A, B, C, D, E Spalten.

Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Zentralkomplexes
Quelle: Nach Williams (1975). J Zool Lond 176, 67-86.

2.1.3 Funktionen des Zentralkomplexes

Es bestehen nicht nur innerhalb des Zentralkomplexes vielfältige Verbindungen, sondern auch zahlreiche Verschaltungen mit anderen Gehirnteilen, wie den optischen Loben und den Pilzkörpern. Zusätzlich wurden unterschiedliche Neurotransmitter in diesem Bereich nachgewiesen. Diese Fakten weisen darauf hin, dass der Zentralkomplex vielfältige Funktionen erfüllt. Dort werden verschiedene Sinneseindrücke, wie z.B. visuelle und olfaktorische integriert (*Drosophila*: Kahsai und Zars, 2011) und memoriert. Auch wird der Zentralkomplex, wie die Pilzkörper, als Sitz der spatialen Orientierung und des Ortsgedächtnisses angesehen (Zentralkomplex *Drosophila*: Liu et al., 2006; Neuser et al., 2008) und trägt zur lokomotorischen Steuerung bei (z.B. der Beine: Martin et al., 1999; Bender et al., 2010). Ebenso werden im Zentralkomplex assoziative Leistungen ausgeführt. So werden z.B. bei fliegenden Insekten die Informationen über den Winddruck via sensorische Zellen der Antennen an den Zentralkomplex geleitet, wodurch dieser entsprechende Informationen an die Flugmuskulatur ausgibt und infolgedessen die Flugbewegungen angepasst werden (Ritzmann et. al., 2008).

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass im ellipsoiden Körper und in der protocerebralen Brücke des Zentralkomplexes der Heuschrecke topographische Repräsentationen von linear polarisiertem Licht (E-Vektor) codiert werden (Heinze und Homberg, 2009) und dadurch für die Heuschrecke eine räumliche Orientierung am so genannten Himmelskompass möglich ist (Vitzthum et al. 2002). Insekten wie die Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* verfügen am dorsalen Rand ihres Komplexauges über Photorezeptoren mit Pigmentmolekülen (dipolare Chromophore), die sich an der Membran der Mikrovilli befinden. Die Dipole der Chromophore sind parallel zur Membranoberfläche der Mikrovilli ausgerichtet. Je nach Anordnung der Mikrovilli sind diese Zellen nur auf bestimmte Winkel des polarisierten Lichts empfindlich und können so die E-Vektoren des Himmels codieren. Diese Informationen gelangen über mehrere Verarbeitungsschritte innerhalb der optischen Loben (Lamina, Medulla, Lobula) über Projektionsneuronen in den modular aufgebauten Zentralkomplex. In den Kolumnen des Zentralkörpers wird die Orientierung des E-Vektors durch unterschiedliche Aktivitätssraten von Neuronen codiert. Es handelt sich dabei unter anderem um die kolumnaren Zellen CL1 und tangentiale Neuronen der PB, die als TB2 bezeichnet werden (Heinze und Homberg, 2007, 2009). Auch sind Neuronen des anterioren optischen Tuberkels (AOTu) in *Schistocerca gregaria* an der Verarbeitung des polarisierten Lichts beteiligt (El Jundi und Homberg, 2012). Diese Gehirnregion ist über Projektionsneuronen mit dem Zentralkomplex verknüpft. Dies unterstreicht die Erkenntnis, dass der Zentralkomplex

als integrative Einheit bei der Verarbeitung von polarisiertem Licht wirkt (*Locusta*: Homberg et. al., 2011; Insekten: Träger und Homberg, 2011). Auch bei *Drosophila melanogaster* wurde die Orientierung am Himmelskompass mit polarisiertem Licht bestätigt (Weir und Dickinson, 2012). In dieser Spezies wurde zudem gezeigt, dass in bestimmten Schichten des Zentralkörpers Projektionen von visuellen Objekteigenschaften codiert werden (Pan et al., 2009).

Diese beiden Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der Zentralkomplex in seinen Kolumnen (Ortskodierung) und in seinen Nervenschichten (Merkmalskodierung) die räumliche und visuelle Orientierung und Objekteinordnung integriert. Forscher der Universität Würzburg fanden in der Taufliege *Drosophila melanogaster* zwei feste Neuronenschichten, die optische Erinnerungen speichern (Liu et al., 2006). Diese Zellgruppen befinden sich im Zentralkörper. Dabei werden keine kompletten Bilder in diesen Arealen gespeichert, sondern in einer der Zellgruppen die Höhe des Musters im Sehfeld der Fliege, in der anderen Zellgruppe Neigungen von bestimmten Kanten.

Der Zentralkomplex von Insekten ist nicht nur an der Sensorik und Gedächtnisbildung beteiligt, sondern integriert und steuert auch lokomotorisches Verhalten, wie z.B. die Beinbewegung oder die Stridulation. Dies konnte durch verschiedene Untersuchungen mit visuellen, chemischen oder mechanischen Stimuli an Insekten bestätigt werden. Elektrische Stimulation des Zentralkomplexes von Grillen führt zu Störungen der Beinbewegungen beim Zirpen (Huber, 1960), pharmakologische Stimulation im Zentralkomplex in der Heuschrecke zu mehr Stridulation (Heinrich et al., 2001). Elektrische Ableitungen am Zentralkörper von *Blaberus discoidalis* und die taktile Stimulation der Antennen, zeigen eine Beteiligung des ellipsoiden Körpers und der protocerebralen Brücke an der Steuerung der Laufgeschwindigkeit und der Beinbewegungen (Bender et al., 2010). Genetisch induzierte Mutationen in *Drosophila* zeigen, dass der ellipsoide Körper und die protocerebrale Brücke an der Steuerung der Geschwindigkeit, der Laufrichtung und an der zeitlichen Koordination der Laufbewegungen beteiligt sind (Strauss et al., 1992; Strauss und Heisenberg, 1993; Martin et al., 1999; Strauss, 2002).

2.1.4 Embryonale und adulte Entwicklung des Zentralkomplexes

In hemimetabolen Insekten wie der Acrididae *Schistocerca gregaria* wird der Zentralkomplex zwischen 50 und 80% der embryonalen Entwicklung ausgebildet (Williams und Boyan, 2008). Dagegen entsteht der Zentralkomplex in holometabolen Insekten wie *Drosophila* als Folge der indirekten Entwicklung postembryonal (Abbildung 7).

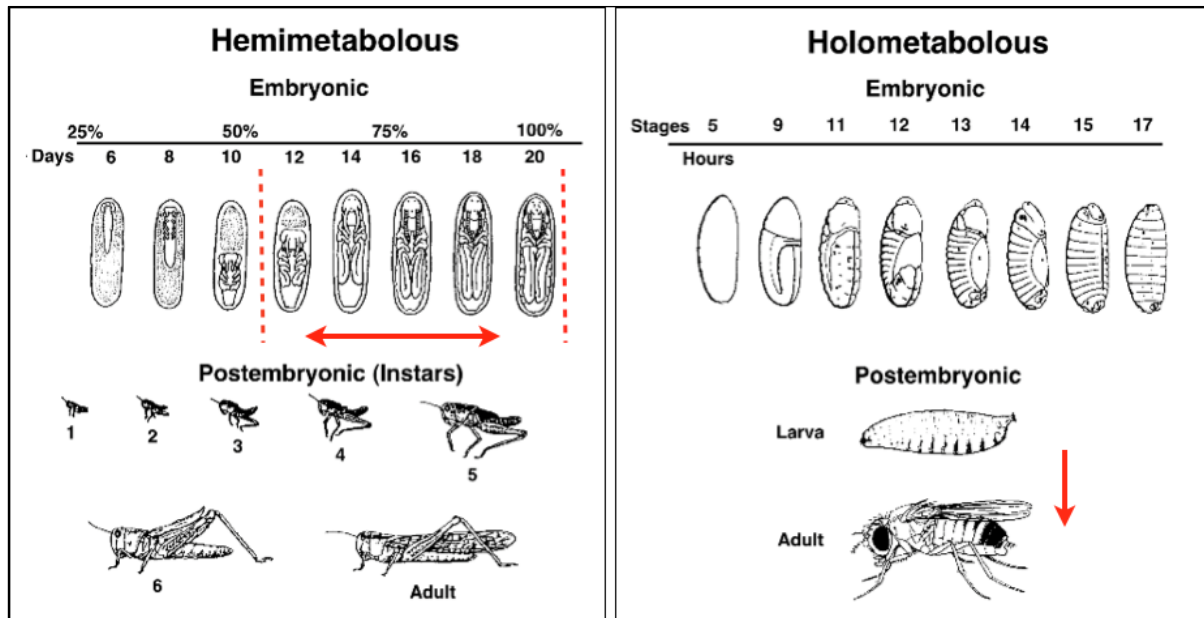


Abbildung 7: Vergleich der Entwicklung der hemimetabolen *Schistocerca gregaria* und der holometabolen *Drosophila melanogaster*
 Quelle: George Boyan, Vorlesung: Fundamentals in Neurobiology 2013.

Erläuterungen zu Abbildung 7:

Bild links: 25% bis 100% der Embryonalentwicklung. 6 bis 20 Tage der Embryogenese. 1 bis 6 Larvenstadien.

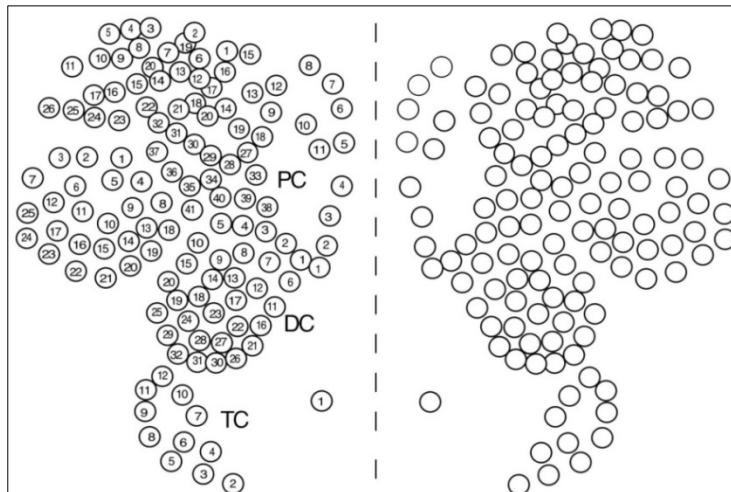
Bild rechts: Zeitraum von der fünften bis zur siebzehnten Stunde der Embryonalentwicklung.

↔ ↓ Zeitraum der Zentralkomplexentwicklung.

Der unterschiedliche Entwicklungszeitpunkt weist auf die vielfältigen Funktionen des Zentralkomplexes hin. So wird diesem Neuropil bei holometabolen Insekten eine Rolle beim Schlüpfen und Häuten zugeschrieben (Stay und Tobe, 2007), in hemimetabolen Insekten auch bei der Ernährungsumstellung von Eidotter auf feste, pflanzliche Nahrung (Predel und Wegener, 2006). Um diese Funktionen erfüllen zu können, muss der Zentralkomplex beim Schlüpfen bzw. beim Häuten vollständig ausgebildet und die benötigten Neuromodulatoren bereits vorhanden sein.

2.2 Kartierung der Neuroblasten im Gehirn von Insekten

In der Wüstenheuschrecke entsteht aus 130 neuronalen Stammzellen, die stereotyp angeordnet sind, das zentrale Gehirn ausgenommen der optischen Loben. Die Neuroblasten des PC, Deutocerebrums (DC) und Tritocerebrums (TC) wurden 1993 von Zacharias et al. kartiert (Abbildung 8). In der Abbildung 8 sind der Pars intercerebralis 20, dem Protocerebrum 41, dem lateralen Protocerebrum 25, dem Deutocerebrum 32 und dem Tritocerebrum zwölf Neuroblasten zuzuordnen.



Abkürzungen in Abbildung 8:

PC Protocerebrum.

DC Deutocerebrum.

TC Tritocerebrum.

○ Neuroblast.

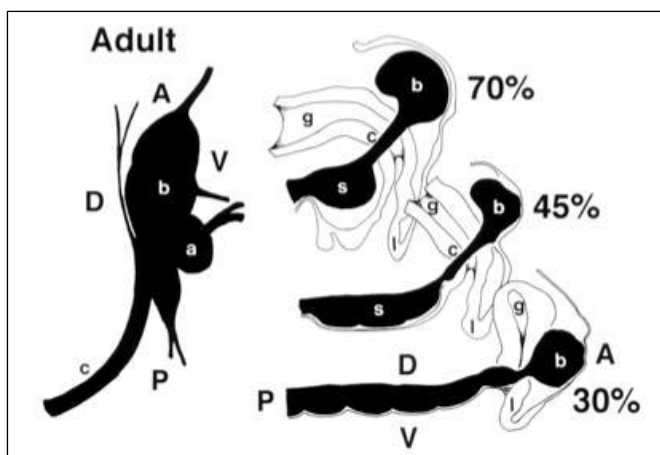
Nummerierung nach
Zacharias et al., 1993.

Abbildung 8: Kartierung der Neuroblasten im
Embryonalgehirn (45%) von *Schistocerca gregaria*
Quelle: Nach Zacharias, Williams, Meier,
Reichert (1993). Development 118, 941-955.

Aufgrund ihrer Lage und der Expression des Segmentpolaritätsgens *engrailed* (Boyan und Williams, 2002) wurden die NBs den einzelnen Gehirnneuromeren Proto-, Deuto- und Tritocerebrum zugeordnet (*Drosophila melanogaster*: Reichert und Boyan, 1997; *Schistocerca gregaria*: Boyan und Williams, 2002). Die Lage und Gruppierung eines Teils der Neuroblasten verändert sich jedoch während der Embryonalentwicklung und in Ausnahmefällen erfolgt die Positionsänderung einzelner Neuroblasten über Neuromergrenzen hinweg. Ein tritocerebraler Neuroblast (Abbildung 49, rote Pfeilspitze) wandert beispielsweise während der Embryonalentwicklung ca. 200µm weit (Boyan und Williams, 1997; Urbach und Technau, 2003).

In der modernen Neurobiologie wird die stereotype Lage von NBs nicht mehr auf die Körperachsen bezogen beschrieben, sondern auf die Neuralachsen. Diese Neuorientierung wird notwendig, da die cerebrale Struktur weiter in die Kopfkapsel wandert und dabei um ca. 90° abknickt, neuronale Strukturen und das Stomodeum Platz beanspruchen und einzelne Neuroblasten der Pars intercerebralis wandern können (Abbildung 9, rote Pfeilspitze in Abbildung 49).

Bei der Kartierung durch Zacharias et al. (1993) wird die Lage einzelner Neuromere, Neuropile und neuronaler Vorläuferzellen im Bezug zu den Körperachsen beschrieben, ohne morphologische oder molekulare Gehirncharakteristika zu berücksichtigen. Die Orientierung des Nervensystems ändert sich jedoch während der Entwicklung bezüglich dieser Achsen kontinuierlich. Unterschiedliche Orientierungen des Gehirns in Bezug zu den Körperachsen zeigen sich auch im Vergleich verschiedener Insektenspezies. Um eine fortlaufende Beschreibung der Gehirnausrichtung und die Vergleichbarkeit zwischen Arten zu ermöglichen, wird eine topologische Kartierung des Nervensystems notwendig. Dabei beziehen sich Lage und Orientierung des Gehirns auf Neuralachsen, nicht auf Körperachsen. Durch den Bezug zu Neuralachsen ist zudem ein Vergleich der Lage von Neuroblasten und Neuropilen im Gehirn und ventralen Bauchmark möglich (Doe und Goodman, 1985a).



Abkürzungen in Abbildung 9:

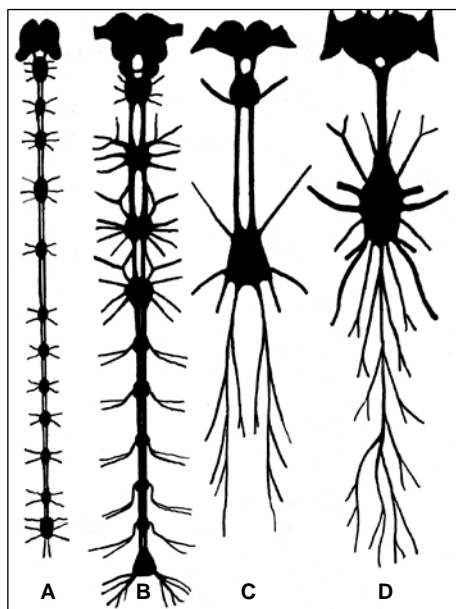
A anterior. D dorsal. V ventral. P posterior.
a Antennallobus. b Gehirn.
c circumoesophageales Konnektiv. g Darm.
l Labrum. s suboesophageales Ganglion.

Abbildung 9: Veränderung der Gehirnorientierung im Vergleich zu den Körperachsen im Laufe der Embryogenese von *Schistocerca gregaria*.
Quelle: Boyan, Williams, Reichert (1995c).
J Comp Neurol 361, 429-440.

In dieser Arbeit wird die Anordnung der Gehirnneuroblasten von *Schistocerca gregaria* in Abhängigkeit der Topologie des zentralen Nervensystems neu definiert und dementsprechend eine neue Neuroblastenkarte des Gehirns erstellt.

2.3 Neuronale Entwicklung in Insekten

Das Insektennervensystem besteht grundsätzlich aus einem peripheren und einem zentralen Teil. Das periphere Nervensystem besteht unter anderem aus den sensorischen Afferenten und den Innervierungen der Muskeln. Das Zentralnervensystem (ZNS) setzt sich aus dem Gehirn (supraoesophageales Ganglion), den optischen Loben und dem Bauchmark (suboesophageales Ganglion, Thorakal-, Abdominalganglien) zusammen. Ebenso besteht in Insekten das vegetative Nervensystem, das mit dem ZNS verbunden ist. Es innerviert und reguliert hauptsächlich den Darmkanal und die Geschlechtsorgane, dazu gehören z.B. das stomatogastrische Ganglion (z.B. Innervierung der Vorderdarmmuskulatur) und die Innervierung der Speicheldrüsen. Auch der retrocerebrale Komplex wird zum vegetativen Nervensystem gezählt und besteht aus Corpora allata, Corpora cardiaca und Frontalganglion. Er sezerniert verschiedene Hormone wie z.B. Allatostatine zur Steuerung von Häutungsvorgängen (Stay und Tobe, 2007), Pyrokinine mit myomodulatorischen und diuretischen Funktionen (Predel und Wegener, 2006) und Neuromodulatoren wie FMRFamid (Homborg et al., 1991a, b; siehe auch Review: Nässel, 1993a). Die Morphologie des Bauchmarks führt zur Bezeichnung Strickleiternnervensystem (Abbildung 10). Die Bauchmarkganglien können unterschiedlich stark bis komplett miteinander verschmolzen sein. In den thorakalen Segmenten befinden sich in ursprünglichen Insekten drei Ganglien: Pro-, Meso- und Metathorakalganglion. Es schließen sich acht Abdominalganglien an.



Erklärungen zu Abbildung 10

- A Nervensystem *Japyx*.
- B Nervensystem *Blatta*.
- C Nervensystem *Belostoma*.
- D Nervensystem *Musca*.

Abbildung 10: Schematische Darstellung von verschiedenen Insektennervensystemen
Quelle: Imms, 1967. Outlines of Entomology.

In Acrididae wie der Wüstenheuschrecke liegen im Kopfbereich das komplexe Gehirn und das suboesophageale Ganglion. Das weitere zentrale Nervensystem besteht aus:

- Unterschlundganglion, verschmolzen aus Mandibular-, Maxillar- und Labialganglion
- Prothorakalganglion
- Mesothorakalganglion
- Metathorakalganglion, bestehend aus Thorakalganglion und drei Abdominalganglien
- Terminalganglion, bestehend aus achtem Abdominalganglion und drei weiteren Ganglien.

Das Terminalganglion beinhaltet das caudale viszerale System und die Innervierungen der Cerci. Es versorgt die Keimdrüsen und den posterioren Teil des Verdauungssystems (Review: Boyan und Ball, 1990).

2.3.1 Allgemeine neuronale Entwicklung und genetische Kontrolle

Zu Beginn der Entwicklung finden grundsätzliche Prozesse statt, z.B. die Festlegung der Körperachsen und der Symmetrie des Körpers. Diese Prozesse wurden sehr genau durch Versuche von Christiane Nüsslein-Volhard, die dafür 1995 den Nobelpreis für Medizin erhielt, an Mutanten von *Drosophila melanogaster* untersucht (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; St. Johnson und Nüsslein-Volhard, 1992).

Die antero-posteriore Körperachse wird durch die Anterior-Klasse, Posterior-Klasse und Terminal-Klasse maternaler Gene festgelegt. Beispiele für Gene der drei Klassen sind: *bicoid* (anterior), *nanos* und *caudal* (posterior), *torso* (terminal). Die Positionsinformation entsteht durch die Ribonukleinsäure (RNS), den Proteinprodukten dieser Gene und deren Konzentrationsgradienten im sich entwickelnden Insektenembryo.

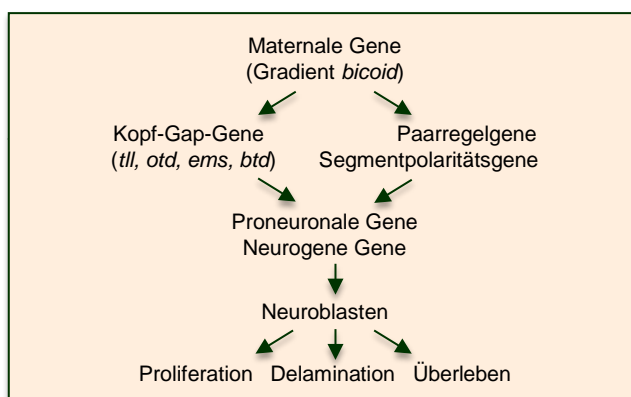
Die dorso-ventrale Körperachse wird durch die Positionierung der maternalen Gene in der Vitellinhülle des Eies festgelegt. Das maternale *toll*-Gen induziert die Abgabe des Spätzle-Fragments an der ventralen Seite. Das dorsal-Protein wandert in den Zellkernen weg vom Spätzle-Fragment und induziert die Positionsinformation entlang der dorso-ventralen Achse.

Bei *Drosophila* werden die Produkte der maternalen Gene translatiert, vermitteln die Positionsinformation und aktivieren die zygotischen Gene des sich entwickelnden Tieres. Die antero-posteriore Achse wird durch folgende Genfamilien festgelegt:

- Lückengene wie z.B. *hunchback* (White und Lehmann, 1986), *krüppel* oder *tailless* (Strecker und Merriam, 1986), die regionale Unterschiede festlegen
- Paarregelgene wie z.B. *even* oder *fushi-tarazu* (Weiner et al., 1984; Lawrence und Johnston, 1989), die ein periodisches Aktivitätsmuster erzeugen und Parasegmente festlegen
- Segmentpolaritätsgene wie z.B. *engrailed* (Fjose et al., 1985; Kornberg et al., 1985) oder *wingless* (Sanicola et al., 1995; Doe und Skeath, 1996), die zuständig für die Musterbildung der Segmente sind
- Selektorgene wie z.B. Homeobox-Gene (Fjose et al., 1985), die die Segmentidentität bestimmen.

Die Segmentierung von *Drosophila* ist am Ende des Blastodermstadiums abgeschlossen. Bei Heuschrecken wie *Schistocerca americana* entwickeln sich weitere einzelne Segmente erst nach dem Blastodermstadium während des Wachstums des caudalen Endes. Dieser Unterschied in der Entwicklung spiegelt sich auch in veränderten Genfunktionen wider. So hat *even-skipped* in der frühen Entwicklung bei *Schistocerca* keine Paarregelfunktion (Patel et al., 1992). In der späteren Entwicklung ähnelt sich die Funktion dieses Gens in *Drosophila* und *Schistocerca*. Die Gene *seven-up* und *prospero* lösen bei *Drosophila* und *Schistocerca* unterschiedliche Entwicklungen der Neuroblastenlinien aus (Broadus und Doe, 1995).

Nach der Befruchtung des Eies und dessen Aktivierung bewirken die maternalen Gene die embryonale Musterbildung. Entsprechend der Gentypen und deren Konzentration am Ort der Zelldifferenzierung bekommt die Zelle ihre individuelle Identität.



Abkürzungen in Abbildung 11:

tll tailless.
otd: orthodenticle.
ems empty spiracles.
btd: buttonhead.

Abbildung 11: Genetische Kontrolle der Gehirnentwicklung bei Insekten.
 Quelle: Younossi-Hartenstein, Green, Liaw, Rudolph, Lengyel, Hartenstein (1997). Dev Biol 182, 270-283. verändert.

Das Gehirn von Insekten besteht aus den drei Gehirneuromeren Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum. Untersuchungen an Mutanten von *Drosophila melanogaster* zeigen unter anderem die Beteiligung zweier Homeobox-Gene, das *orthodenticle* (*otd*) und das *empty spiracles* (*ems*), an der Bildung der Neuromere (Abbildung 11). Im

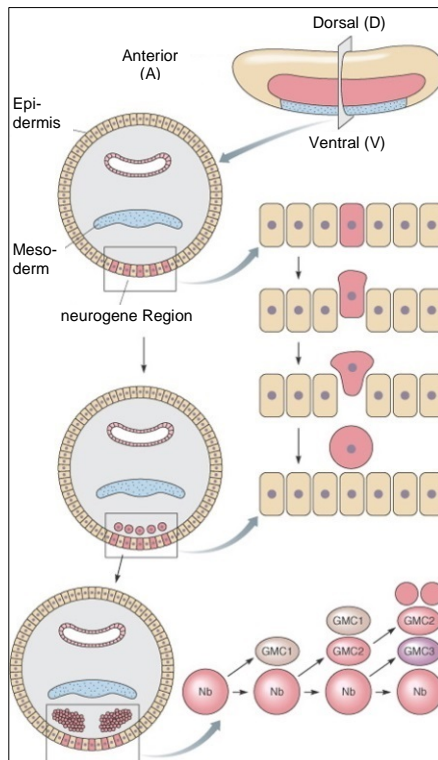
Deutocerebrum werden beide Gene exprimiert, im Protocerebrum nur *otd*, im Tritocerebrum nur *ems*. Fehlt in einer Mutante das *ems*-Gen, entwickeln sich Deuto- und Tritocerebrum nicht oder nur unvollständig, in *otd*-Mutanten fehlt ein Teil bzw. das gesamte Protocerebrum einschließlich der protocerebralen Kommissur (Hirth et al., 1995; Reichert und Boyan, 1997; Younossi-Hartenstein et al., 1997), deren Pionierentwicklung in dieser Arbeit untersucht wird. Ein weiteres Beispiel für an der Entwicklung von Gehirnneuromeren beteiligten Gene ist *buttonhead* (*btd*), welches eine homologe Funktion zu *ems* zeigt (*Tribolium castaneum*: Schinko et al., 2008).

2.3.2 Neuronale Stammzellen im Gehirn und deren Entwicklungslinien

Die Neuroblasten invaginieren im Gegensatz zu der mesektodermalen Mittellinien-vorläuferzelle (MP) aus dem Neuroektoderm wie Abbildung 12 schematisch zeigt (Doe und Goodman, 1985a, b; Goodman und Doe, 1993). Neuronale Stammzellen (NSC) werden je nach ihrer Entwicklung in unterschiedliche Typen eingeteilt. Sie teilen sich in ihre Abkömmlinge, die zu Neuronen oder Glia differenzieren (siehe: Liu und Boyan, 2013). Jede dieser Vorläuferzelle besitzt eine eigene Identität, die determiniert, welche neuronalen Zellen aus ihr entstehen (Hartenstein et al., 2008). Die Identität der Vorläufer wird durch deren Position, dem Zeitpunkt ihrer Entwicklung und der Kombination ihrer Genausstattung festgelegt (Urbach und Technau, 2004; Doe, 2008). Der Entwicklungszeitpunkt der Neuronen spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung komplexer Neuropilmorphologien. Wobei neu entstehende Neuronen sich an den Entwicklungswegen älterer Neuronen orientieren, indem ihre Axone mit Axonen bereits entwickelter Neuronen, die damit als Leitstruktur dienen, faszikulieren.

Derzeit werden zwei Neuroblastentypen unterschieden. Ein Neuroblast des NSC Typs I teilt sich asymmetrisch in eine kleinere Tochterzelle, der Ganglionmutterzelle (GMC) und sich selbsterneuernd in einen Neuroblasten. Die entstandene GMC teilt sich dann symmetrisch in zwei Nachkommenzellen, die sich zu Neuronen oder Glia differenzieren. Dadurch bringt der ursprüngliche Neuroblast über eine für ihn spezifische Anzahl von Teilungen, den Vorgang der Selbsterneuerung und einer Reihe von GMCs bis zu ca. 100 Nachkommen hervor. Dadurch entstehen unterschiedlich große Entwicklungslinien. (Abbildung 12). Auch im Bauchmark entwickeln sich die Linien der neuronalen Vorläuferzellen nach Muster des NSC Typs I (Doe und Goodman, 1985a).

Der Zentralkörper wird in einem kurzen Zeitraum der Embryogenese (50-80%) gebildet: Die ersten Neuroblasten, die für die Bildung des Zentralkomplexes verantwortlich sind, delaminieren zwischen 25 und 30% der Embryonalentwicklung. Eine neue Analyse zeigt erstmals, dass die Neuroblasten des Zentralkomplexes kurz nach 70% der Embryogenese die Proliferation einstellen und bereits bei ca. 80% der Embryonalentwicklung durch Apoptose in den programmierten Zelltod eintreten (Boyan und Liu, 2014). Das heißt innerhalb von ca. 50%



Abkürzungen in Abbildung 12:

A anterior.

D dorsal.

V ventral.

Nb Neuroblast.

GMC Ganglionmutterzelle.

Abbildung 12: Delamination und Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen.
Quelle: Sanes, Reh, Harris (2011). Development of the nervous system. verändert.

der Embryogenese muss demnach die gesamte Anzahl der Zentralkomplexneuronen gebildet werden. Dieses kann allein durch den oben beschriebenen Entwicklungsweg der NSC Typ I nicht erklärt werden. Die schnelle Entwicklung einer großen Anzahl von Neuronen erfordert einen anderen Entwicklungsweg, den der neuronalen Vorläuferzellen des Typs II (Boyan und Reichert, 2011). Der NSC Typ II generiert zusätzliche proliferative Vorläuferzellen, die „intermediate neural progenitors“ (INPs). Diese sorgen durch selbsterneuernde Zellteilungen für eine ausreichend hohe Zahl an Nachkommen. Dieser Entwicklungsweg ist erst 2010 in *Schistocerca gregaria* bei der Entwicklung des Zentralkomplexes entdeckt worden (Boyan et al., 2010b) und daher nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit, wird aber in der Diskussion näher betrachtet.

In dieser Arbeit (Kapitel 5.1.3, 5.1.4) werden die Entwicklungslinien einiger für die Bildung des Zentralkomplexes infrage kommenden Neuroblasten beschrieben.

2.3.3 Pionierneuronen

Pionierneuronen sind die ersten Neuronen, die in einer Nervenbahn im sich entwickelnden Nervensystem auswachsen und als Orientierung für die Navigation nachfolgender Axone dienen. Wie andere Neuronen besteht ein Pionierneuron aus dem Zellsomata, einem Neuriten und dem Wachstumskegel. Der Wachstumskegel findet seine Zielregionen durch die mechanische und zelluläre Beschaffenheit des umliegenden Gewebes, durch die molekularen Eigenschaften des Substrats und durch diffundierende chemische Faktoren wie z.B. den „nerve growth factor“ (NGF) im interzellulären Milieu. Der Wachstumskegel bewegt sich durch den Einbau von Zellmembrankomponenten in amöboider Weise in Richtung Ziel (Taghert et al., 1984). Das Zellsomata des Pionierneurons bleibt fest geheftet am Substrat oder frei in der Nähe seines Entstehungsortes. Der Neurit muss daher durch Filamente kontinuierlich verlängert werden. Pionierneuronen bahnen damit das zukünftige Nervensystem, indem nachfolgende Axone entlang der Neuriten der Pionierneuronen auswachsen und anschließend durch Zelladhäsionsmoleküle zu Nervenbündel faszikulieren.

Die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur, die sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur und die Lateralen Zellen delaminieren wie die Pioniere der Antennen direkt aus dem Epithelium (Boyan und Williams, 2004, 2008). Die Neuroblasten, in deren Entwicklungslinien die Pioniere der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte ihren Ursprung haben, differenzieren aus epithelialen Zellen (Abbildung 1, Abbildung 12). Ein Neuroblast teilt sich nach der Differenzierung asymmetrisch und gibt dabei eine kleinere Tochterzelle, die Ganglionmutterzelle ab, bleibt jedoch bei dieser Teilungsart selbsterneuernd als Neuroblast erhalten. Die entstandene GMC teilt sich dann symmetrisch in zwei Nachkommenzellen, die sich zu Neuronen oder Glia differenzieren. Die ersten Neuronen einer Entwicklungslinie können zu Pionierneuronen werden.

1976 wurden erstmals Pionierneuronen in einem Nervensystem beschrieben und zwar in den Antennen und Beinen von *Schistocerca gregaria* (Bate, 1976; Bentley und Caudy, 1983). 1979 wurden erstmals Pionierzellen in Vertebraten gefunden. Levi-Montalcini und Callissano beschrieben die Gehirnentwicklung von Ratten und Hühnchen in Abhängigkeit von NGF. Sie zeigten, dass Pionierneuronen sich beim Auswachsen an der NGF-Konzentration orientieren.

Pionierneuronen spielen auch in der Gehirnentwicklung von *Scg* eine wichtige Rolle. Einige Pioniere des PC, z.B. die Pioniere der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte des Zentralkomplexes entwickeln sich aus Neuroblasten ähnlich den Pionieren der Kommissuren des Bauchmarks

(Myers und Bastiani, 1993a). Zu den Pionierneuronen des Protocerebrums zählen auch die PCPs, SCNs und LCs (Ludwig et al., 2001; Boyan und Williams, 2008). Die genannten Zellen exprimieren den neuronenspezifischen Marker Meerrettichperoxidase (Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987). Einige Pioniere der anterioren Kommissur exprimieren das Oberflächenglycoprotein Lazarillo (Ganfornina et al., 1995; Sánchez et al., 1995) und können damit eindeutig identifiziert werden. Eine Identifikation der PCPs ist ebenso möglich, da diese die einzigen Zellen im Gehirn sind, die Term-1 exprimieren (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999, 2001). In der Diskussion werden sowohl die Entwicklung der Trakte als auch die Entwicklung der PCPs, SCNs und LCs detaillierter charakterisiert.

Die Pionierneuronen bilden durch Faszikulierung ein axonales Gerüst, das komplexen Neuropilen wie dem Zentralkomplex bei der Entwicklung als Orientierung dient. Die allgemeine Entwicklung eines axonalen Gerüsts wird in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

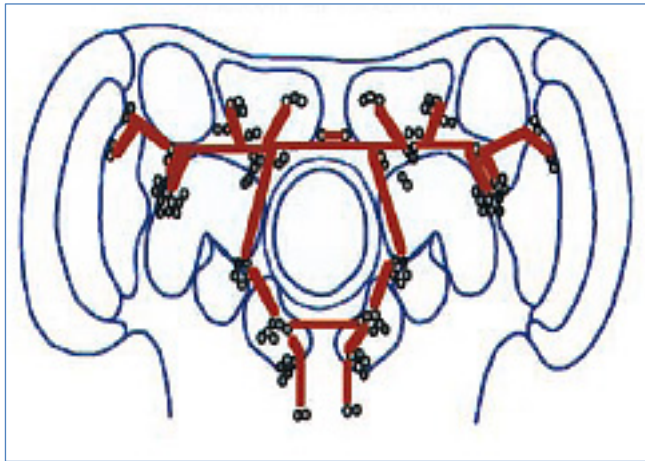
2.3.4 Die Bildung des axonalen Grundgerüsts im Nervensystem von Insekten

Die in 2.3.2 beschriebenen neuronalen Vorläuferzellen bilden im ventralen Bauchmark (Condrón und Zinn, 1994) und in den beiden Gehirnhemisphären der Heuschrecke (Liu und Boyan, 2013; Boyan und Liu, 2014) eine Reihe von unterschiedlichen Neuronentypen und Gliazellen. Im Bauchmark bilden Gliazellen ein Gerüst, an dem sich Axone mit ihren Wachstumskegeln orientieren (*Schistocerca*: Bastiani und Goodman 1986; *Drosophila*: Jacobs und Goodman, 1989a, b; Noordermeer et al., 1998; Hidalgo und Booth, 2000; Vertebraten/Invertebraten: Klämbt, 2009). Die Regulation der Entwicklung erfolgt durch Gene wie *single minded* (*Drosophila*: Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988), *glial cells missing* (*Drosophila*: Hidalgo und Booth, 2000) und über den „epidermal growth factor pathway“ (EGFR)-Signalweg (*Drosophila*: Zak et al., 1990; Scholz et al., 1997). Fehlt das Protein Wrapper, bildet die Glia keine Hüllzellen der Neuronen, was zu deren Apoptose führt und sich die kommissuralen Faszikel nur unvollständig entwickeln (*Drosophila*: Noordermeer et al., 1998). Auch im Gehirn von *Drosophila* orientieren sich die Gliapodien im Zentralkomplex an axonalen Projektionen der benachbarten Neuronen (Izergina et al., 2009). Bestimmte astrocytenähnliche Gliazellen (Repo-positiv, Glutamin-Synthetase (GS)-positiv) des protocerebralen Mittelhirns der Heuschrecke verlassen ihren Ursprungsort und wandern in die Faszikel des posterioren und anterioren kommissuralen Systems ein (*Schistocerca*: Boyan et al., 2011). Eine ähnliche Entwicklung durchlaufen die Neuomere des Bauchmarks in *Drosophila* (Klämbt et al., 1991; Noordermeer et al., 1998; Page, 2004; Klämbt, 2009).

Astrocytenähnliche Gliazellen sind untereinander durch „gap junctions“ (Ansammlung von Kanälen, welche Zellmembranen benachbarter Zellen durchqueren und diese koppeln) verbunden, was durch Farbstoffkopplungsversuche gezeigt wurde (Boyan et al., 2012). Während der Embryogenese wird zwischen den Gliazellen ein kommunizierendes Netzwerk ausgebildet, welches auch im adulten Tier zu beobachten ist. Verschiedene Gliazelltypen umhüllen und infiltrieren Teile des Zentralkomplexes, z.B. die Trakte zwischen protocerebraler Brücke und Zentralkörper, sowie die Faszikel des anterioren und posterioren Kommissurensystems. Es wird vermutet, dass Gliazellen sowohl Funktionen zur Reifung des Zentralkomplexes übernehmen, als auch molekulare Faktoren sezernieren (*Schistocerca gregaria*: Boyan et al., 2012, 2013).

Pionierneuronen, die um das Stomodeum die Leitstruktur für die weitere Entwicklung komplexer Gehirnteile wie dem Zentralkomplex und den Pilzkörpern bilden, werden durch immunhistochemische Färbungen mit dem neuronenspezifischen Marker HRP (Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987) und gegen Fasciclin I, einem Oberflächenmolekül, im Mittelgehirn von *Schistocerca gregaria* bei 30 bis 35% der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Bastiani et al., 1987; Boyan et al., 1995a). Die Neuronen wachsen mit Hilfe ihrer Wachstumskegel entlang von Glia. Die Abbildung 13 zeigt eine schematische Zusammenfassung von Zellkörpern von Pionierneuronen in der Embryonalentwicklung mit ihren Axonen (Reichert und Boyan, 1997). Der Nachweis der Pionierneuronen erfolgte über die Expressionsmuster von HRP und Fasciclin I. Arendt und Nübler-Jung zeigten 1996 Gemeinsamkeiten in der frühen Entwicklung von Gehirnanlagen in Mäusen und Fliegen. Die *orthodenticle*-Genfamilie ist sowohl in Insekten als auch Säugetieren an der Ausbildung von anterioren Gehirnteilen beteiligt (Leuzinger et al., 1998). Auch bei der Entwicklung des menschlichen Pallium und der Pilzkörper von Insekten sind Gemeinsamkeiten erkennbar (Tomer et al., 2010). Grundlegende Mechanismen der Gehirnentwicklungen in Insekten und Vertebraten sind vergleichbar. Damit könnte die Untersuchung dieser Mechanismen in Modellorganismen wie Insekten das Verständnis der Entwicklung komplexer Gehirne verbessern (Reichert und Boyan, 1997; Boyan und Reichert, 2011).

Verschiedene, bereits identifizierte Pionierneuronen wie die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur und die Lateralen Zellen sind an der Bildung dieser Leitstruktur beteiligt und könnten eine Orientierung für die Entwicklung der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte bieten. Die Entwicklung dieser Zellen und die Entwicklung der Trakte sind Gegenstand dieser Arbeit.

**Erläuterungen zu Abbildung 13:**

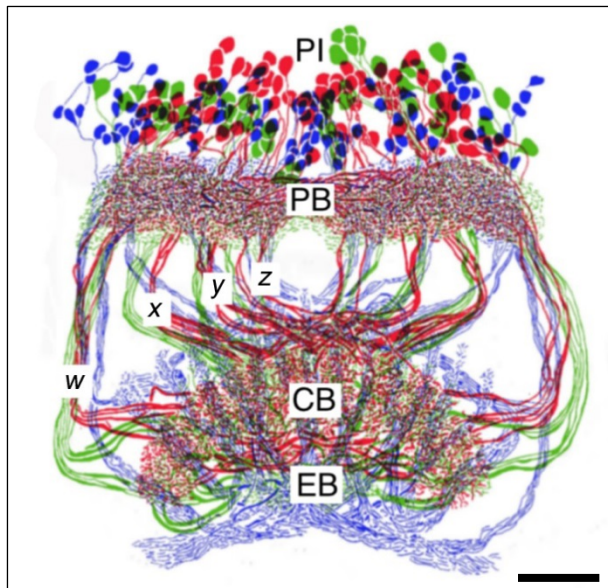
○ Zellkörper der Pionierneuronen.

— Axone.

Abbildung 13: Axonales Gerüst aus Pionierneuronen in *Scg*.
Expressionsmuster Schema von HRP und Fasciclin I.
Quelle: Reichert, Boyan (1997). Trends Neurosci 20, 258-264.

2.4 Gene und neuroaktive Moleküle im Gehirn von Insekten

An Entwicklungsprozessen und Funktionen des Körperbaus und des Gehirns von Insekten und Crustaceen sind verschiedene Gene und neuroaktive Moleküle beteiligt, so wird die Segmentierung des Körpers und der Ganglien von Arthropoden z.B. durch Gene wie *engrailed* und *wingless* gesteuert. Neuromodulatoren integrieren und regulieren Prozesse der Zelldifferenzierung, Neurogenese und Axogenese (*Schistocerca*: Condrón, 1999; *Homarus*: Richards et al., 2003; *Drosophila*: Sykes und Condrón, 2005; *Locusta*: Stern et al., 2007). Veränderungen im Verhalten, Physiologie und Morphologie zwischen der solitären und gregären Lebensphase der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* werden neurohormonell z.B. durch das Amin Serotonin (5HT), Glutamat und Acetylcholin geregelt (Rogers et al., 2004). Die Entwicklung der Neuroarchitektur des Zentralkomplexes ist in hemimetabolen Insekten wie der Heuschrecke bereits in der Embryogenese abgeschlossen, die molekularen Expressionsmuster entwickeln sich jedoch bis in die adulte Phase weiter. Expressionsmuster der Moleküle wurden bis dato entweder in Crustaceen (Kreissl et al., 1999; Review: Harzsch, 2003; Richards et al., 2003) oder anderen Insekten (*Periplaneta americana*: Eckert et al., 1999, 2002; Predel et al., 2003; Predel und Wegener, 2006) einschließlich der adulten *S. gregaria* und *S. americana* (Homberg, 1991, 1994, 2002; Vitzthum et al., 1996) aufgezeigt, scheinen aber im Arthropodenreich Homologien aufzuweisen. Eine Zusammenfassung der Expressionsmuster von Neuromodulatoren in der adulten *Scg* ist in Abbildung 14 dargestellt.



Erklärungen zu Abbildung 14:

Rot Serotonin.

Blau allatostatinexprimierendes kolumnares Neuron Typ 1 (ASC 1).

Grün allatostatinexprimierendes kolumnares Neuron Typ 2 (ASC 2).

Abkürzungen in Abbildung 14:

PI Pars intercerebralis.

PB protocerebrale Brücke.

w, x, y, z Trakte.

CB Zentralkörper.

EB ellipsoider Körper.

Abbildung 14: Schematische Zusammenfassung der Expression von Neuromodulatoren im Zentralkomplex im adulten Heuschreckengehirn. Maßstab: 90µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110.

Die embryonalen Expressionsmuster des Proteins des Segmentpolaritätsgens *engrailed* und der Botenstoffe Serotonin, Locustatachykinin, FLRFamid, Allatostatin, Periviscerokinin und Pyrokinin werden in dieser Arbeit untersucht (Kapitel 5.3).

2.4.1 Das Gen *engrailed* (*en*)

Die Beteiligung verschiedener Genfamilien in der Embryogenese wurde in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Zu den Segmentpolaritätsgenen gehört *engrailed*. *Engrailed*-Färbungen in *Drosophila* zeigen in jedem Segment das posteriore Kompartiment an (Fjose et al., 1985; Kornberg et al., 1985). Damit kann *engrailed* als ein molekularer Marker angesehen werden, der *Drosophila*-Segmente definiert. Das Expressionsmuster von *engrailed* während der sich entwickelnden Segmentierung von *Drosophila*, *Schistocerca* und *Malacostraca* wurde 1989 von Patel et al. beschrieben. Im Gegensatz zu *engrailed* ist *invected* an der Bildung und der Spezifizierung des anterioren Kompartiments beteiligt (Simmonds et al., 1995). Im selben genetischen Signalweg definiert *wingless* die Abgrenzung zwischen dem anterioren und posterioren Kompartiment. In *wingless*-Mutanten werden die Flügel nicht ausgebildet (Sanicola et al., 1995). Um die Neuroblasten bei ihrer Neukartierung eindeutig den einzelnen Gehirnneuromeren zuordnen zu können, wird das embryonale Expressionsmuster von *engrailed* untersucht.

2.4.2 Serotonin (5HT-ICC)

Serotonin ist ein klassischer Neurotransmitter. 5HT-ICC ist an Entwicklungsprozessen wie der Zelldifferenzierung, der Neurogenese und der Axogenese beteiligt. Condon (1999) beschreibt serotonerge Wachstumskegel in der frühen Embryogenese des Heuschreckengehirns, die die Gehirnmittellinie überschreiten. Im Crustaceen *Homarus americanus* ist Serotonin an der Entwicklung der neuronalen Innervierung des stomatogastrischen Systems beteiligt (Richards et al., 2003). Sykes und Condon (2005) dokumentierten serotoninbildende Bereiche im ZNS von *Drosophila*. Die Differenzierung von einigen Nerven im ZNS von *Locusta migratoria* wird ebenfalls durch Serotonin gesteuert (Stern et al., 2007). Serotonin ist am Übergang der solitären zur gregären Lebensphase der *Schistocerca gregaria* beteiligt. Durch taktile Stimulation eines Haares am Sprungbein, die wiederholt werden kann, wird über aufsteigende Verschaltungen im Bauchmark unter anderem die Ausschüttung von Serotonin im Gehirn erhöht und damit gregäres Verhalten induziert (Rogers et al., 2003, 2004). Außerdem zeigt Roeder (2002) eine Beteiligung von Serotonin an der Kontraktionskontrolle der Skelettmuskulatur und der viszerale Muskeln im adulten Insekt. Bei Vertebraten koordiniert Serotonin z.B. die biochemische Differenzierung von Neuronen und deren Funktionen (Maus: Gaspar et al., 2003). Serotonin ist damit ein Neurotransmitter, der sowohl an embryonalen Entwicklungsprozessen beteiligt ist, als auch adulte Funktionen des Zentralkomplexes in Insekten steuert.

2.4.3 Locustatachykinin (LomTK)

Tachykinine wirken hormonell, modulatorisch und als Transmitter. Diese Diversität hängt von den unterschiedlichen Typen der Tachykinin-Rezeptoren ab (Severini et al., 2002). In verschiedenen embryonalen Nervensystemen wie z.B. in *Spodoptera litura* (Kim et al., 1998) und *Cricetinae* (Antle et al., 2005) werden Tachykinine schon früh in der Entwicklung exprimiert. Sie erfüllen eine neurohormonelle Rolle. Peptide der Tachykininfamilie können sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten zusätzlich als neurotrophe Faktoren wirken (Review: Satake et al., 2003; Maus: Catalani et al., 2006), zum Beispiel in sich entwickelnden respiratorischen neuronalen Netzwerken von Ratten (Wong-Riley und Liu, 2005). LomTK zeigt in Vertebraten und Invertebraten vielfältige Funktionen in der Steuerung von Entwicklungsprozessen, darunter neuroprotektive und -degenerative Vorgänge (Severini et al., 2002).

2.4.4 Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin-Amid (FLRFamid)

Die FLRFamide gehören zur Familie der Phenylalanin-Methionin-Arginin-Phenylalanin-Amide. FLRFamide wurden in verschiedenen Insekten wie z.B. in *Drosophila* (Nichols, 1992) und *Locusta migratoria* (Schoofs et al., 1997) gefunden. Robb et al. konnten 1989 die von der Scg-FLRFamid-Konzentration abhängige Muskelkontraktion über die Stimulation der langsamen und exzitatorischen Motoneuronen nachweisen. Ebenso ist FLRFamid im Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria* vorhanden und ist an der Regulation des Fressverhaltens beteiligt. Außerdem steuert es die lokomotorische Koordination der Tibiamuskulatur (Robb und Evans, 1994).

2.4.5 Allatostatin (AST)

Allatostatine sind pleiotrop und sind an der Steuerung von Entwicklungsprozessen beteiligt. Als Neurohormon inhibieren die Allatostatine die Synthese des juvenilen Hormons über die Corpora allata. Das juvenile Hormon ist für die Steuerung der larvalen Häutungen von Insekten und Crustaceen notwendig (Stay und Tobe, 2007). Auch in der Entwicklung von neuronalen Netzwerken, beispielsweise jener der Darmmuskulatur, wirkt AST inhibierend (*Periplaneta*: Rankin et al., 1998; *Orconectes limosus*: Dirksen et al., 1999; *Idotea*: Kreissl et al., 1999).

2.4.6 Periviscerokinin (PVK) und Pyrokinin (PK)

Kinine sind Neuropeptide und Neurohormone. Massenspektrometrische Untersuchungen des zentralen Nervensystems und von neurohämalen Organen haben Mitglieder der Periviscerokinin-Familie, das Lom-PVK 1, Lom-PVK 2 und Scg-PVK-3 sowie der Pyrokinin-Familie, Scg-PK 1 bis 7, bei *Schistocerca gregaria* gezeigt (Clynen et al., 2003a, b). Es wurden jedoch bisher keine einzelnen periviscerokinin- oder pyrokininpositive Neuronen in der Heuschrecke beschrieben, da spezifische Antikörper für derartige Untersuchungen noch nicht entwickelt wurden.

Periviscerokinine sind die wichtigsten neuroaktiven Moleküle in neurosekretorischen Organen und Interneuronen des zentralen Nervensystems bei verschiedenen Insektenarten. So zeigen z.B. kolumnare Fasern im Nervensystem von *Periplaneta americana* eine Färbung

gegen Periviscerokinin (Eckert et al., 1999). Es sind bisher keine Funktionen der PVKs in der Neurogenese oder der Differenzierung von Neuronen bekannt. Die Kenntnis von myomodulatorischen und diuretischen Funktionen der Periviscerokinine und Pyrokinine führt zu der Hypothese: Die postembryonale Expression dieser Moleküle ist relevant für den Übergang von der embryonalen zur adulten Ernährung (Predel und Wegener, 2006).

Ziel dieser Arbeit ist unter anderem die Beschreibung der embryonalen, larvalen und adulten Entwicklung der Expressionsmuster verschiedener Botenstoffe.

2.5 Das Modelltier *Schistocerca gregaria*

Aufgrund der bereits verfügbaren Neuroblastenkarte (Zacharias et al., 1993), der bereits identifizierten Neuronen LCs, PCPs und SCNs und der exakten Beschreibung der adulten Expressionsmuster wichtiger Botenstoffe fiel die Wahl des Modelltieres auf die Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* Forskål (Insecta, Orthoptera, Ensifera, Acrididae).

An diesem Modelltier, können allgemeingültige neuronale Entwicklungsmechanismen wie Entwicklungslinien neuronaler Vorläuferzellen und die Entwicklung einzelner identifizierter Neuronen untersucht werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sind weitestgehend auf Vertebraten übertragen. Außerdem können die Ergebnisse zum Verständnis von neuronalem Tumorwachstum und zur Ausdifferenzierung von Neuronen z.B. bei Rückenmarksverletzungen beitragen.

Weitere für dieses Tier sprechende Gründe sind:

- Leicht herzustellende Bedingungen zur Haltung und Zucht
- Kurze Embryonalentwicklung (bei den in dieser Arbeit verwendeten Haltungsbedingungen 17 Tage)
- Möglichkeit einer genauen Altersbestimmung des Embryos durch äußere Merkmale (Sprungbeinform, Antennen, Körperfärbung)
- Größe des Embryos und des Gehirns, die Einzelzellfärbungen und Einzelzellanalysen zulassen
- Möglichkeit, Neuronen immunhistochemisch über mehrere Altersstufen hinweg zu identifizieren und deren Entwicklung so zu verfolgen
- Einfache Präparationsmöglichkeit des Gehirns.

Im Folgenden wird näher auf das Modelltier *Schistocerca gregaria* eingegangen: Peter Forskål (1732-1763) hat während einer Arabienexpedition (Ägypten und Jemen) *Schistocerca gregaria* zum ersten Mal beschrieben.

Die Wüstenheuschrecke kommt frei lebend in Afrika, im Mittleren Osten und in Asien vor. Sie wird vom Kopf bis Schwanzende bis zu 10 cm lang, wiegt nur bis zu fünf Gramm und lebt einzeln (solitär) oder in Schwärmen (gregär) mit bis zu 80 Millionen Tieren. Sie ernähren sich von Pflanzen (Getreide, Gras, Blätter, Früchte, Samen, Gemüse, usw.) in erheblichen Mengen. Die tägliche Fressmenge kann dem eigenen Körpergewicht entsprechen. Somit kann ein Heuschreckenschwarm (Abbildung 15) mit einer Nahrungsaufnahme von bis zu 400 Tonnen pro Tag, innerhalb weniger Stunden ganze Ernten vernichten.



Abbildung 15: Schwarm *Schistocerca gregaria*
Quelle: <http://www.sciencemag.org/content/312/5778/1320/F1.medium.gif>.



Abbildung 16: Solitäre *Schistocerca gregaria*
Quelle: <http://www.st-andrews.ac.uk/~wjh/jumping>



Abbildung 17: Gregäre *Schistocerca gregaria*
Güntner (2005).

Früher wurden die verschieden gefärbten Wüstenheuschrecken als unterschiedliche Arten eingeordnet. Tatsache ist jedoch, dass eine taktile Stimulation an einem Haar des Sprungbeinfemurs zu einer erhöhten Serotoninausschüttung im Thorakalganglion führt, wodurch innerhalb von vier Stunden eine Änderung des solitären zum gregären Verhalten stattfindet (Anstey et al., 2009). Diese Überleitung kann durch die Reizung am entsprechenden Haar wiederholt ausgelöst werden (Rogers et al., 2003). Beim Übergang von der solitären zur gregären Phase und umgekehrt zeigt sich eine Zu- oder Abnahme der Konzentration bei zwölf weiteren Neurotransmittern und Neuromodulatoren (Aspartat, Glutamat, Glycin, GABA, Arginin, Taurin, Acetylcholin, Tyramin, Citrullin, Dopamin, Octopamin und N-Acetyldopamin) zeigt sich eine Zunahme oder Abnahme der Konzentration. Die Verringerungen bzw. Erhöhungen der Konzentrationen bewirken den Übergang von der solitären zur gregären Lebensphase der Heuschrecke und umgekehrt. Weitere an der Phasenänderung beteiligte Transmitter und Modulatoren müssen in zukünftigen Versuchen gefunden werden. Die Farbänderung des Körpers von *Schistocerca* von rosa zu gelb bzw. umgekehrt, erfolgt innerhalb weniger Entwicklungsstadien bzw.

Generationen (Rogers et al., 2003, 2004). Die Zugehörigkeit zur gregären oder solitären Phase hängt von der Populationsdichte innerhalb der Wüstenheuschreckenbevölkerung ab.

Die embryonale Entwicklung im Ei dauert unter Standardlaborbedingungen (bis 30% Luftfeuchtigkeit, Temperatur ca. 30°C und 12/12h Licht-/Dunkelrhythmus) 17 Tage. Die Entwicklungsstadien im Embryo lassen sich durch die Morphologie der Sprungbeine, der Antennen und der Körperfärbung des Embryos auf das Prozent genau bestimmen (siehe Bentley et al., 1979 bei *Schistocerca nitens*). Ein Prozent Embryonalentwicklung dauert unter den gegebenen Laborbedingungen ca. fünf Stunden. Die Larvalstadien sind durch Größe und Färbung unterscheid- und bestimmbar.

3 Zielstellung

Der adulte Aufbau des Zentralkomplexes und einiger seiner Funktionen sind bekannt, nicht jedoch seine detaillierte embryonale Entwicklung in *Schistocerca gregaria*. Diese Entwicklung zu untersuchen und zu beschreiben ist Ziel der Arbeit. Dazu werden die molekularen und die zellulären Entwicklungen untersucht. Ebenso soll der zeitliche Ablauf der Embryonalentwicklung der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte des Zentralkomplexes charakterisiert werden. Die einzelnen Ziele und die zu beantwortenden Fragen sind folgende:

1. Der Zentralkomplex und die Pilzkörper in Insekten zeigen einen modularen Aufbau. Charakteristisch für den Zentralkomplex sind die *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte.
 - ♦ Aus welchen Neuroblasten des Protocerebrums entstehen die Trakte?
 - ♦ Welche Faktoren steuern die korrekte, stereotype Ausbildung der Trakte?
 - ♦ Kann die Hypothese „Axone finden ihren charakteristischen Zielort in ihrer Zellgruppe durch ihren individuellen Entstehungszeitpunkt in der Embryogenese“ bewiesen werden?

2. Komplexe Neuropile im Insektengehirn brauchen ein Gerüst aus Axonen und Glia als Leitstruktur, um sich bei ihrer Bildung orientieren zu können und um ihre Struktur richtig aufzubauen. Die Wachstumskegel der Neuronen dieser Neuropile faszikulieren dabei mit diesem Gerüst und finden dadurch zu ihrem Zielort. Es ist bekannt, dass die Lateralen Zellen und die Pioniere der protocerebralen Kommissur mit ihren jeweiligen Nachkommen an diesem Grundgerüst beteiligt sind. Unbekannt ist, wie aus diesen Zellen das Gerüst entsteht. Mit der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen behandelt werden:
 - ♦ Aus welchem Keimblatt stammen die Lateralen Zellen und die Pioniere der protocerebralen Kommissur?
 - ♦ Lässt sich die Hypothese „die genannten Zellen stammen aus dem Mesektoderm“ bestätigen?
 - ♦ Sind die Zellen neuronalen Ursprungs?
 - ♦ Mit welchen Zellen im Protocerebrum faszikulieren die LCs und PCPs?
 - ♦ Welche Entwicklungslinien bilden LCs und PCPs?

3. Die vielfältigen Funktionen komplexer Neuronenstrukturen werden durch Neuro-
modulatoren, Amine und Botenstoffe gesteuert. Um die Funktionen dieser Moleküle im
embryonalen und adulten Zentralkomplex zu verstehen, müssen folgende Fragen
beantwortet werden:

- ♦ Welche Neuromodulatoren werden bereits im Heuschreckenembryo
exprimiert?
- ♦ Zu welchem embryonalen Entwicklungszeitpunkt treten Neuromodulatoren
zum ersten Mal in Erscheinung?
- ♦ Können Rückschlüsse aus dem Erscheinungszeitpunkt der Neuromodulatoren
auf deren jeweilige Funktionen und auf die Funktionen des Zentralkomplexes
gezogen werden?

Nach Beantwortung dieser Fragen, kann ein genaueres Bild der embryonalen Entwicklung,
des Aufbaus und der Funktionen des Zentralkomplexes beschrieben werden. Zusätzlich
können allgemeine entwicklungsbiologische Mechanismen aufgeklärt werden.

4 Material und Methoden

Unter Einhaltung, der von der DFG herausgegebenen Richtlinien, erfolgte die Tierzucht und -haltung, ebenso die Vorbereitung und Präparation der embryonalen, larvalen und adulten Heuschrecken.

Im Folgenden werden Zucht- und Haltungsbedingungen der Versuchstiere *Schistocerca gregaria*, die Präparier- und Färbetechniken, sowie die Immunhistochemie, Histologie, Mikroskopiertechniken und die digitale Bildbearbeitung beschrieben.

4.1 Forschungsmaterial

Die Embryos, Larven und Adulte von *Schistocerca gregaria* stammten aus der eigenen Zucht der Arbeitsgruppe im Department Biologie II, Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Tiere wurden unter folgenden Bedingungen gehalten und gezüchtet.

4.1.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in einem fensterlosen Raum mit einer Luftfeuchtigkeit von bis zu 30% und einer Temperatur von ca. 28°C. Automatisch wurde dieser Raum in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden gehalten.

Etwa 300 Tiere beider Geschlechter in verschiedenen Entwicklungsstadien lebten verteilt auf sechs Metallkästen (0,5m x 0,4m x 0,5m = 0,1m³) mit einer Vorderfront aus Plexiglas und einem Lüftungsgitter als Dach. Die Ausstattung der Kästen bestand aus einer Möglichkeit zur Eiablage, aus einem Gitter zur Ablage der Futtermittel und Petrischalen für Futter und Wasser. Die Fütterung von gekeimtem Weizen (ca. 10 cm hoch) und angefeuchteten Haferflocken erfolgte einmal täglich von Montag bis Freitag. Für das Wochenende wurden die Tiere mit Bio-Weißkohl versorgt.

Die Reinigung der Zuchtkästen und der Futterablagen erfolgte täglich, außer am Wochenende.

4.1.2 Zucht der Modelltiere

Da Heuschrecken in ihrer natürlichen Umgebung ihre Eipakete ca. fünf Zentimeter mit dem Ovipositor in den Sand injizieren, wurde im Zuchtkasten ein Plastikbecher mit feuchtem Vermiculit[®] zur Verfügung gestellt. Die Befruchtung der Eier wurde durch die gleichzeitige Haltung beider Geschlechter im Zuchtkasten gewährleistet.

Erfahrungen zeigten, dass die Heuschrecken bei Fütterung von nicht biologisch angebautem Futter nicht zur Eiablage fähig waren.

4.1.3 Altersbestimmung

Für die geplanten Untersuchungen war die prozentuale Altersbestimmung der Embryonen notwendig. Sie erfolgte entsprechend der Sprungbeinform, Antennen- und Körperfärbung des Embryos nach Bentley et al. (*Schistocerca nitens*: 1979). Fünf Stunden entsprachen bei den oben genannten Haltungsbedingungen einem Prozent der Embryonalentwicklung. Die Gesamtentwicklung der Embryonen dauerte bis zum ersten Larvalstadium ca. 17 Tage.

4.2 Vorbereitung der Präparate

Abhängig vom Ziel der Untersuchung und vom Alter der Forschungstiere kamen unterschiedliche Präpariermethoden, Färbemethoden, Einbettungs- und Schnittverfahren zum Einsatz.

4.2.1 Präparieren des Untersuchungsmaterials

Embryonengehirne, larvale und adulte Gehirne waren Gegenstand der Untersuchungen. Um die Tierschutzrichtlinien der DFG einzuhalten, wurden die Tiere vor dem Präparieren entweder durch Kälte (adulte *Scg* auf Eis, Embryos in eiskalter phosphatgepufferter Saline) oder mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) betäubt.

4.2.1.1 Präparieren der Embryonen aus dem Ei

Die Eier von *Schistocerca gregaria* wurden unter 0,2M phosphatgepufferter Saline (PBS) am animalen Pol des Eies angestochen, um eine Druckminderung im Ei zu erreichen. Anschließend wurde das Ei mit einer kleinen Präparierschere am vegetativen Pol aufgeschnitten, der Embryo vorsichtig entnommen und mit Pinzette und Präpariernadel von Dotter bzw. embryonalen Hüllen befreit. Damit stand der Embryo zur Analyse zur Verfügung.

4.2.1.2 Präparieren der Larven- und Adultengehirne

Im Gegensatz dazu muss bei Larven und adulten Tieren nach der Betäubung zuerst die Kopfkapsel aufgebrochen und das Gehirn heraus präpariert werden. Dazu wurde den Tieren unter Formaldehyd mit Hilfe einer Schere der Kopf abgetrennt und mit Pinzetten das gesamte Gehirn entnommen.

4.2.2 Einbettungsverfahren und Schnitte

Verschiedene immunzytochemische und histochemische Verfahren erforderten unterschiedliche Einbettungsverfahren. Das Einbetten und Schneiden kann vor oder nach der Färbung erfolgen.

4.2.2.1 Herstellung von Schnitten mit Eponeinbettung

Zur Einbettung in Epon mussten die Präparate entwässert werden. Dazu wurden die Embryos bzw. die Gehirne jeweils eine Stunde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (vergälltes Ethanol: 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) und Propylenoxidether behandelt. Zur Untersuchung einzelner Zellfärbungen wurden von diesen in Epon eingebetteten Präparaten Schnitte von 20µm Stärke angefertigt.

4.2.2.2 Herstellung von Schnitten mit Agaroseeinbettung

Alternativ wurden Embryos unter PBS seziert und Gehirne von Larven und adulten Tieren unter eiskaltem Puffer herauspräpariert. Die Gewebe wurden über Nacht in Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, anschließend in PBS gewaschen und bei 55-60°C in 5%iger Agarose/PBS eingebettet. Die erkalteten Agaroseblöcke wurden auf einem Vibratom von Leica in 40-50µm dicke Schnitte geteilt. Die Schnitte wurden in 0,1M PBS von der Agarose befreit und auf Menzel-Gläser aufgezogen.

4.2.3 Eindeckeln der Präparate

Geschnittene und gefärbte Präparate wurden zur Mikroskopie mit Glycerol, Vectashield® (Vector Laboratories), SlowFade™ Antifade (MPE, Leiden), Permount™ oder PBS bedeckt und mit einem Deckgläschen gedeckelt.

4.3 Immunzytochemische Färbemethoden

In der Immunzytochemie werden monoklonale und polyklonale Antikörper (AK) gegen bestimmte Antigene verwendet. Diese Antigene können sich z.B. auf Zelloberflächen befinden. Die Antikörper werden zumeist in der Maus oder im Kaninchen hergestellt.

In dieser Arbeit wurden immunzytochemische Einzel- und Doppelfärbungen gegen verschiedene Neuromodulatoren durchgeführt. Sämtliche Antikörper werden in Tabelle 1 und Tabelle 2 mit Herkunft gelistet.

Antigen	1. Antikörper	Quelle Katalognummer	Wirt	Konzentration	2. Antikörper
Engrailed	4D9	C.S. Goodman Geschenk	Maus	1:1	GAM-PO
Serotonin	5HT-ICC	Dako, UK 50758	Maus	1:100	GAM-Cy3
Locustatachykinin	K1-50820091	H. Agricola Geschenk	Kaninchen	1:1000	GAR-Alexa-488
FLRFamid	FA1155-0100	BioTrend, Deutschland SP-101855-5	Kaninchen	1:500	GAR-Alexa-488
<i>Dip</i> -Allatostatin	<i>Dip</i> -AST I	H. Agricola Geschenk	Kaninchen	1:5000	GAR-Alexa-488
Periviscerokinin, Pyrokinin	(<i>Pea</i>)-PVK II	M. Eckert Geschenk	Kaninchen	Fertigserum	GAR-Alexa-488
Neuronenspezifisch	HRP	Jackson ImmunoResearch 323-005-021	Kaninchen	1:200	GAR-FITC
Lazarillo	10E6	D. Sánchez Geschenk	Maus	1:200	GAM-FITC
Mesektoderm- spezifisch	Mes-3	E. Ball Geschenk	Maus	1:3	GAM-Cy3
Axon-spezifisch	8B7	M. Bastiani Geschenk	Maus	1:200	GAM-FITC

Tabelle 1: Immunzytochemie, Einzelfärbungen.

Die immunzytochemische Färbemethode mit nachfolgendem Schneiden erfolgte, indem der Embryo aus dem Ei seziert (siehe 4.2.1.1) und in Piperazinethansulfonsäure (PIPES) und/oder Formaldehyd (FA) (100mM PIPES, 2mM Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), 1mM

MgSO₄, 3,7% Paraformaldehyd; pH-Wert 7,4) 60 Minuten fixiert wurde. Nach einstündigem Waschen in PBS wurden die Embryonen für 60 Minuten in das Präinkubationsmedium eingelegt. Dieses bestand entweder aus einem Gemisch aus PBS und Triton X-100 (PBT) oder fetalem Kälberserum (FCS) in 0,2M PBS. Triton X-100 und FCS blockieren unspezifische Bindungsstellen und dienen dem Vermeiden falsch positiver Färbungen. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper (siehe Tabelle 1 und 2), einem weiteren Waschvorgang in PBS und der Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper wurden die Embryonen entweder als „Whole-Mount“ (vollständiges Präparat) untersucht oder, wie in 4.2.2 beschrieben, eingebettet und geschnitten.

Wirt 1. Antikörper	Wirt Ziege 2. Antikörper	Quelle, Katalognummer	Konzentration	Mikroskop
Maus	GAM-PO	Dako EnVision, Z0420	1:4	Lichtmikroskop
Kaninchen	GAR-PO	Dako EnVision, K4011	1:4	Lichtmikroskop
Maus	GAM-Cy3	Dianova, 115-165	1:200, 1:300	Konfokalmikroskop
Kaninchen	GAR-Alexa-488	Invitrogen, A-11070	1:200	Konfokalmikroskop
Kaninchen	GAR-FITC	Dianova, 111-095	1:200	Konfokalmikroskop
Maus	GAM-FITC	Dianova, 115-095	1:200	Konfokalmikroskop
Kaninchen	GAR-TRITC	Sigma, T2659	1:200	Konfokalmikroskop

Tabelle 2: Immunzytochemie, Einzelfärbungen und Doppelfärbungen, 2. Antikörper.

4.3.1 Färbung gegen das Antigen *engrailed*

Der monoklonale Antikörper 4D9 gegen das Segmentpolaritätsgen *engrailed*, welches die posterioren Kompartimente von Segmenten definiert, wurde erstmals von Patel et al. (1989) hergestellt.

Für die *engrailed*-Immunzytochemie wurden die Embryos 16 Stunden bei Raumtemperatur im primären Antikörper 4D9 (C.S. Goodman, San Francisco, USA) inkubiert. Die Konzentration des Antikörpers betrug 1:1 in der Präinkubationslösung. Nach dem Waschen in PBT wurden die Embryos vier Stunden bei Raumtemperatur im zweiten Antikörper goat-anti-mouse Peroxidase (GAM-PO) von Dako EnVision™ (Katalognummer: Z0420), in einer Konzentration von 1:4 in PBT gelöst, inkubiert. Nach erneutem Waschen, wurde die Diaminobenzidin (DAB)-Färbung mit dem DAB-Tabletten-System von Sigma® (Katalognummer: D4293) entwickelt. Zur Intensivierung der Färbung wurde 0,075%iges Ammoniumnickelsulfat verwendet (Boyan und Williams, 2002). Die DAB-Reaktion wurde

mit PBS gestoppt und die Embryos in 90%iges Glycerol (verdünnt in PBS) überführt. Wie unter 4.2.2.1 beschrieben erfolgte anschließend die Einbettung in Epon, das Schneiden und das Eindeckeln (4.2.3).

4.3.2 Färbung gegen den Neuromodulator 5HT-ICC

Condrón und Zinn isolierten 1998 erstmals einen Antikörper gegen Serotonin in der Heuschrecke und etablierten das Färbeprotokoll. Da Serotonin an verschiedenen Entwicklungsprozessen wie der Zelldifferenzierung, der Neurogenese und der Axogenese beteiligt ist, wird dessen Expressionsmuster hier untersucht.

Die präparierten Embryos (vgl. 4.2.1.1) wurden in Epon eingebettet und Schnitte angefertigt (vgl. 4.2.2.1). Die auf Objektträgern aufgezogenen Schnitte wurden für zwölf Stunden bei 4°C in eine Feuchtkammer, gefüllt mit monoklonalen Serotonin-Antikörpern 1:100 verdünnt in PBS, gestellt. Nach einem vierstündigen Waschvorgang der Präparate in 0,1M PBT wurden sie für weitere zwölf Stunden bei 4°C in eine Feuchtkammer im sekundären Antikörper goat-anti-mouse Zytocrom-3 (GAM-Cy3) 1:200 in PBT gelöst, inkubiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C in 0,1M PBS in Dunkelheit gewaschen, in Vectashield® eingedeckelt (vgl. 4.2.3) und für die Konfokalmikroskopie vorbereitet.

4.3.3 Färbung gegen *LomTK*

Die erste Herstellung des Antikörpers erfolgte 1993 (Nässel, 1993b). Die Spezifität des Antikörpers Anti-*LomTK* wurde mit Hilfe eines „enzyme-linked immunoadsorbent assay“ (ELISA) mit synthetischen *LomTK* I und II und Callitachykinin I und II 1995 bewiesen (Nässel et al., 1995).

Der polyklonale Locustatachykinin-Antikörper K1-50820091 ist spezifisch gegen C-Endigungen von *Locusta migratoria* (*Lom*)-TK I und *LomTK* II (GFYGVGR). Präparierte Embryos wurden, wie in 4.2.2.2 beschrieben, in Agarose eingebettet, geschnitten und auf Menzel-Gläser aufgezogen. Der primäre Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 gelöst im Präinkubationsmedium, wirkte darauffolgend vier Stunden ein. Nach einem vierstündigen Waschgang erfolgte die Inkubation im zweiten Antikörper goat-anti-rabbit (GAR)-Alexa-488

in einer Konzentration von 1:200 in PBT über Nacht bei 4°C in Dunkelheit. Für die Vorbereitung zur Konfokalmikroskopie wurden die Schnitte wie unter 4.2.3 gedeckelt.

4.3.4 Färbung gegen FLRFamid

Ein Antikörper gegen FMRFamid wurde das erste Mal 1977 von Price und Greenberg in der Riesenvenenmuschel *Macrocallista nimbosa* isoliert. Der polyklonale Antikörper gegen FLRFamid FA1155-0100, zugehörig zur FMRFamid-Familie, wirkt gegen dessen C-terminale Domäne. In einem Kontrollexperiment wurden Präparate in synthetischem FMRFamid in einer Konzentration von 0,12M bzw. 0,1M *Diploptera punctata* (*Dip*)-Allatostatin inkubiert. Im Gegensatz zu *Dip*-Allatostatin verhinderte FMRFamid die Immunfärbung (Homberg et al., 1999).

Für die Färbung mit dem FA1155-0100-Antikörper in einer Konzentration in PBT von 1:500 wurden die Embryonen wie unter 4.2.1.1 beschrieben präpariert, in Epon (siehe 4.2.2.1) eingebettet und analog zu 4.3.2 weiterbehandelt. Der sekundäre Antikörper GAR war mit Alexa-488 gekoppelt. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 4.2.3 beschriebenen.

4.3.5 Färbung gegen *Diploptera punctata*-AST

Vitzthum et al. stellten erstmals 1996 einen polyklonalen Antikörper gegen Allatostatin I von *Diploptera punctata* *Dip*-AST I her. Der Antikörper wurde mit einem synthetischen Allatostatin I (APSGAQLRYGFGLamid) in Kaninchen hergestellt. Die Spezifität wurde mit einem ELISA gegen *Dip*-AST I bis IV verifiziert (Vitzthum et al. 1996).

Der AK wurde in einer Konzentration von 1:5000 im Präinkubationsmedium gelöst. Eine Kreuzreaktion mit *Dip*-AST I-Serum und Corazonin, crustaceen kardioaktiven Peptiden (CCAP), FMRFamid, Leucomyosuppressin, Locustatachykinin I, Perisulfakinin und Proctolin kann ausgeschlossen werden (Vitzthum et. al., 1996). Die Embryonen wurden wie unter 4.2.1.1 beschrieben präpariert, in Epon eingebettet und Schnitte (4.2.2.1) für die Färbung mit dem 1. Antikörper APSGAQLRYGFGLamid, angefertigt. Auch hier wurde als zweiter Antikörper ein GAR-Alexa-488 Antikörper verwendet. Die folgende Vorgehensweise entsprach dem Punkt 4.3.2.

4.3.6 Färbung gegen PVK und PK

Es wurde ein Antiserum gegen *Periplaneta americana* (Pea)-PVK II verwendet, welches von Eckert et al. beschrieben (1999, 2002), hergestellt und zur Verfügung gestellt wurde. Das Antiserum enthält einen unreinen Antikörper, der Pyrokinine, Periviscerokinine und den Metallothioneinrezeptor-2 (MT-2) färbt (Clynen et al., 2003a).

Nach Vorbereitung der Embryonen, wie unter 4.2.1.1 beschrieben, erfolgte die Präinkubation in diesem Fall nur für zwei Stunden und bei Raumtemperatur in 0,1M PBT. Die Präparate wurden für zwölf Stunden bei 4°C in einer Feuchtkammer mit dem ersten AK inkubiert. Das Vorgehen mit dem sekundären Antikörper GAR-Alexa-488 erfolgte analog zu 4.3.2.

4.3.7 Färbung gegen HRP

HRP gehört zu den Oberflächen-Glykoproteinen, zu welchen auch Zelladhäsions- und Signalmoleküle gezählt werden (*Drosophila*, *Schistocerca*: Snow et al., 1987). Jan und Jan haben 1982 in Insekten festgestellt, dass neuronale Membranen HRP-positiv sind, Gliazellen dagegen HRP-negativ. Neuroblasten, Ganglionmutterzellen und INPs sind ebenso HRP-negativ (Jan und Jan, 1982; Boyan und Reichert, 2011).

Der neuronenspezifische HRP-Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:200 in PBT gelöst. Die Inkubationsdauer des Antikörpers gegen HRP betrug bei Einzelfärbungen fünf Tage, bei Doppelfärbungen mit anti-Lazarillo drei Tage jeweils bei 4°C. Bei Einzelfärbungen wurden die Embryos in 0,1%igem PBT gewaschen, bei Doppelfärbungen in 0,2M PBS. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper GAR-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erfolgte in einer Konzentration von 1:200 im Präinkubationsmedium für vier Stunden bei 4°C. Einige Embryos wurden alternativ mit einem sekundären Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert war, für drei Tage bei 4°C inkubiert, mit DAB gefärbt und die Färbung mit 0,075%igem Ammoniumnickelsulfat intensiviert (Boyan und Williams, 2002). DAB-gefärbte Embryos wurden in weichem Epon eingebettet und anschließend von den Präparaten 20µm-Schnitte angefertigt (vgl. 4.2.2.1).

4.3.8 Färbung gegen Lazarillo

Lazarillo wurde von Ganfornina et al. (1995) beschrieben und spezifiziert. Der primäre Antikörper gegen das Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-gekoppelte Lipocalin Lazarillo Mab 10E6, hatte eine Konzentration von 1:2 für Einzelfärbungen und 1:3 für Doppelfärbungen. Die Inkubationsdauer betrug bei Einzelfärbungen fünf Tage, bei Doppelfärbungen mit anti-HRP drei Tage bei 4°C. Für Einzelfärbungen wurden die Embryos in 0,1%igem PBT gewaschen, für Doppelfärbungen in 0,2M PBS. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper GAM-FITC erfolgte in einer Konzentration von 1:200 im Präinkubationsmedium für drei Stunden bei Raumtemperatur. Die Einbettung erfolgte in Epon wie unter 4.2.2.1 beschrieben.

4.3.9 Färbung gegen Mes-3

Der Mes-3-Antikörper wird von Zellen mesektodermalen Ursprungs exprimiert. Er wurde erstmals 1984 von Kotrla und Goodman im Bauchmark der Heuschrecke hergestellt. Zudem erbrachten sie den Nachweis, dass Zellen mesektodermalen Ursprungs Mes-3-positiv sind, dagegen neuroektodermale Zellen Mes-3-negativ (Kotrla und Goodman, 1984).

Um in dieser Arbeit den ektodermalen Ursprung von neuronalen Vorläuferzellen im Zentralkomplex identifizieren zu können, wurde der Embryo aus dem Ei präpariert (4.2.1.1), in Epon eingebettet und geschnitten (4.2.2.1). Analog zur Serotonin-Färbung (vgl. 4.3.2) wurden die Präparate in einer Feuchtkammer mit Anti-Mes-3 in einer Konzentration von 1:3 drei Tage bei 4°C inkubiert. Es folgte die Behandlung mit dem sekundären Antikörper GAM-Cy3, in einer Konzentration von 1:300 im Präinkubationsmedium für drei Stunden bei 4°C und anschließend das Eindeckeln wie unter 4.2.3 beschrieben.

4.3.10 Färbung gegen 8B7

Der Antikörper 8B7 bindet an die Akt2-Isoform der Proteinkinase B. Die Akt2-Kinase besteht aus einer N-Terminalen (PH)-Domäne, einer zentralen Kinase und einem hydrophoben C-Ende mit regulatorischer Funktion. In *Drosophila* (Seeger et al., 1993) und in *Schistocerca* (Boyan et al., 2010b) wird die Akt2-Kinase in der frühen Entwicklung in Neuroblasten und deren Nachkommen und später in axonalen Projektionen exprimiert. Durch die Expressionsmuster wurde die Beteiligung von 8B7 an Entwicklungsprozessen bestätigt (Seeger et al., 1993).

Nach bekannter Vorbereitung der Embryos (4.2.1.1), erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper 8B7. Dieser erkennt axonspezifische Antigene des zentralen Nervensystems in Insekten. Die Konzentration des primären Antikörpers im Präinkubationsmedium betrug 1:200, die des sekundären Antikörpers GAM-FITC 1:300. Bei beiden Antikörpern dauerte die Inkubation 48 Stunden bei 4°C wobei die Embryos nach jedem AK jeweils eine Stunde in 0,2M PBS gewaschen wurden. Nach dem zweiten Antikörper erfolgte für mindestens drei Stunden ein Klärung in Glycerol und die Eindeckelung in SlowFadeTM Antifade oder Vectashield[®] (vgl. 4.2.3).

4.3.11 Doppelfärbungen

Die Präparation und Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte analog zur jeweiligen Einzelfärbung der verwendeten Antikörper (4.2.1.1, 4.3). Für Mes-3/HRP-Doppelfärbungen (vgl. Einzelfärbungen 4.3.7 und 4.3.9) wurden die sekundären Antikörper GAM-Cy3 und GAR-FITC jeweils in einer Konzentration von 1:300 im Präinkubationsmedium gelöst. Die Inkubation mit diesen Antikörpern erfolgte für 48 Stunden bei 4°C. Für HRP/Lazarillo-Doppelfärbungen (vgl. Einzelfärbungen 4.3.7 und 4.3.8) wurden die sekundären Antikörper GAM-FITC und GAR-Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) jeweils in einer Konzentration von 1:200 verwendet (siehe Tabelle 3). Die Inkubation dauerte 3 Tage bei 4°C. Das Eindeckeln folgte analog zu den Einzelfärbungen (4.2.3).

Antigen 1	1. Antikörper	2. Antikörper	Antigen 2	1. Antikörper	2. Antikörper
Neuronen-spezifisch	HRP	GAR-FITC, 1:300	mesektoderm-spezifisch	Mes-3	GAM-Cy3, 1:300
Neuronen-spezifisch	HRP	GAR-TRITC, 1:200	Lazarillo	10E6	GAM-FITC, 1:200

Tabelle 3: Immunzytochemie, Doppelfärbungen.

Zusätzlich wurden Doppelfärbungen mit Serotonin und allen oben genannten Peptiden durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte nach der Immunhistochemie mit Serotonin (siehe 4.3.2) 4h mit 0,1M PBS-Triton X gewaschen. Die AK-Färbungen der Peptide mit in Kaninchen hergestellten Antikörpern und das Hinzufügen der Zweitantikörper erfolgte wie bei den oben beschriebenen Einzelfärbungen (4.3.3 bis 4.3.6).

4.4 Histochemische Färbemethoden

Mit histochemischen Färbemethoden werden Gewebe durch direktes Einfärben mit bestimmten Farbstoffen oder Metallionen zur mikroskopischen Untersuchung vorbereitet. In der vorliegenden Studie wurden Färbungen des Heuschreckengehirns mit Osmium und Nitroblautetrazolium vorgenommen.

4.4.1 Wigglesworth Osmiumtetroxid-Ethylgallat-Färbung

Die Embryos wurden in PBS wie unter 4.2.1.1 beschrieben aus dem Ei präpariert, das Alter nach Bentley et al. (1979) bestimmt und in Carnoy-Lösung (60% Ethanol, 30% Chloroform, 10% Eisessigsäure) für 1 Stunde fixiert. Anschließend wurden die fixierten Embryos in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser überführt. Es erfolgte eine zweite Fixierung in 1%igem Osmiumtetroxid je nach Embryogröße für mindestens 17-48 Stunden. Danach wurden die Präparate auf dem Schüttler in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Intensivierung der Färbung wurde gesättigtes (Originalmethode ungesättigt) Ethylgallat für 48 Stunden bei Raumtemperatur statt bei 4°C, wie die Originalmethode vorschreibt (Wigglesworth, 1957, 1975, 1988), verwendet. Durch diese Modifikation der ursprünglichen Methode wird der massive Ausfall von Ethylgallat in Form von schwarzen Kristallen vermieden. In diesen 48 Stunden wurde die Ethylgallatlösung mehrmals ausgetauscht. Anschließend erfolgte ein weiteres Waschen in destilliertem Wasser. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zu Propylenoxid wurden die Präparate entwässert. Die Einbettung erfolgte in weichem Epon (4.2.2.1). Als Vorbereitung für die Lichtmikroskopie, wurden Schnitte von 14µm Stärke angefertigt und mit PermountTM auf Objektträgern gedeckelt.

4.4.2 NADPH-Diaphorase Färbung

Die histochemische Methode der Diaphorase-Färbung ist eine etablierte Färbung zum indirekten Nachweis von Stickstoffmonoxid NO (Seidel und Bicker, 2002; Kurylas et al., 2005). NO ist in *Schistocerca gregaria* an Prozessen wie Zellproliferation, Musterbildung und Axogenese beteiligt (Ball und Truman, 1998; Seidel und Bicker, 2000). Ott und Williams haben diese Methode für die Arbeitsgruppe angepasst und standardisiert (Kurylas et al., 2005; Williams et al., 2005).

Die Embryos wurden in Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure (HEPES) gepufferter Saline (140mM NaCl, 5mM KCl, 5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 100mM Sucrose, 20mM

Glukose, 5mM HEPES, pH-Wert 7,2) aus dem Ei präpariert. Die Fixierung erfolgte in einer eiskalten 1:9-Mischung aus Methanol und 37%igem Formaldehyd für 30-60 Minuten. Als Vorbereitung zur Färbung wurden die Embryos vorsichtig in 0,1%igem Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-puffer gespült und anschließend auf dem Schüttler mit Tris-Triton-X (0,1M Tris, pH-Wert 8,0, 0,2%iges Triton X-100) gewaschen. Die Färbelösung bestand aus 0,2mM Nitroblautetrazolium und 0,2mM NADPH in Tris-Triton-X. Die Färbung erfolgte über 18 Stunden, bei 4°C, in der Dunkelheit unter leichtem Schütteln. Die Präparate wurden auf ihre Farbintensität geprüft und bei zu schwacher Färbung zur Intensivierung bei Raumtemperatur erneut gefärbt. War die Färbung ausreichend, wurden die Präparate in destilliertem Wasser gewaschen und zum Schutz vor Gefrierbrand mit einer eiskalten Lösung aus 20%iger Sucrose in 0,1M Phosphatpuffer und 0,005%igem Natriumazid für zwei bis drei Stunden eingelegt bis die Präparate auf den Boden des Gefäßes sanken. Die Einbettung erfolgte in Jung-Gefriermedium (viskos, wasserlöslich; Leica Biosystems, Deutschland) in Mulden mit Messinguntergrund. Es erfolgte eine Behandlung mit flüssigem Stickstoff. Die gefrorenen Blöcke wurden mit einem Kryostaten in 30µm Stücke geschnitten. Die Schnitte wurden auf Chromalaun-Gelatine-Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Mikroskopieren wurden diese mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Glycerolgelatine unter Deckgläschen gedeckelt.

4.5 Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-bildgebende-Massenspektrometrie (MALDI-IMS)

Die adulten Gehirne von *Schistocerca gregaria* wurden wie in 4.2.1.2 beschrieben präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Präparate wurden ohne Einbettung auf einem Kryostaten geschnitten und auf mit Indiumoxid überzogene, damit konduktive Glasobjektträger (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Deutschland) aufgebracht. Die Schnitte wurden in 70%igem und 100%igem Ethanol eingelegt, unter Vakuum getrocknet und mit MALDI-Matrix bedeckt. Die Matrix bestand aus α -cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit einer Konzentration von 7 mg/ml in einer 50:50-Mischung (v/v) von Wasser und Acetonitril mit Trifluoressigsäure (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Massenspektrometrie wurde auf einem Ultraflex III MALDI-Tandem-Flugzeit-Massenanalysator (TOF/TOF, Time of Flight) von Bruker durchgeführt im Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (aktuell: HelmholtzZentrum München). Mit der Software FlexControl 3.0 und FlexImaging 2.1 von Bruker erfolgten die Messungen und

Dokumentationen. Der untersuchte Massenbereich der Neuropeptide der Schnitte betrug 500-6000 Da mit einer Sammelrate von 0,1 GS/s. Der Durchmesser des Laserstrahls betrug 50µm. Der vorher auf dem Objektträger lokalisierte Zentralkomplex und andere Neuropile im Gehirn wurden an ausgewählten Stellen jeweils zweihundertmal mit dem Laser beschossen und die Peptidmassen mit dem TOF-Detektor gemessen.

4.6 Gewebekultur und Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einlagerung

Für die histologische BrdU-Färbung wurden vollständige *Schistocerca gregaria* Embryos in einer Kultur zum Wachstum angeregt. Die Eier wurden dazu in 70%igem Ethanol für 60 Sekunden zur Reinigung und Desinfektion der Außenseite eingelegt und auf Filterpapier getrocknet. Zur Präparation der Embryos (vgl. 4.2.1.1) wurden die Eier in dieser Untersuchung in ein Medium bestehend aus gefiltertem, sterilisiertem Insektenmedium (Mitsubishi und Marmorosch, Sigma), 10%igem FCS, Penicillin und Streptomycin jeweils in einer Konzentration von 5µl/ml und 20%igem Hydroxyecdysol (150µg/ml) überführt. Zur Einlagerung von 5-Bromdesoxyuridin wurden die Embryonen in Zellkulturschalen mit oben beschriebenem Medium und BrdU in einer Endkonzentration von 10mM bei 30°C und unter leichtem Bewegen auf dem Schüttler gehalten. Unter diesen Kulturbedingungen dauerte es 15-16 Stunden, um den für die Analyse nötigen Entwicklungsfortschritt von ca. 3% zu erreichen. Diese Weiterentwicklung wurde durch eine erneute Altersbestimmung (vgl. 4.1.3) nach Bentley et al. (1979) bestätigt.

Entsprach die Embryonalentwicklung den Analyseansprüchen, erfolgte die einstündige Fixierung der Embryonen in PIPES-FA. Anschließend wurden die Embryos auf dem Schüttler in PBS gewaschen und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) für 20 Minuten in 2N HCl denaturiert.

Für die BrdU-Immunzytochemie wurden die Embryos für 45 Minuten in eine Lösung aus 0,4%igem PBT, die unspezifische Bindungsstellen blockiert, 5% Normal Goat Serum (NGS) und 0,2%iges bovines Serumalbumin (BSA) gelegt. Der primäre Antikörper gegen BrdU der Firma Sigma (Katalognummer: B8434) wurde in einer Konzentration von 1:200 in der blockierenden Lösung für 24 Stunden bei 4°C mit leichter Bewegung verabreicht. Die Embryos wurden anschließend in 0,025%igem PBT gewaschen und mit dem sekundären Antikörper GAM-PO (Dako EnVision™), gelöst in einer Konzentration von 1:4 in PBS, 15

bis 16 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Bewegen auf dem Schüttler, inkubiert. Die Embryos wurden erneut in PBS gewaschen und mit DAB gefärbt (DAB-Tabletten System von Sigma). Die Färbung wurde bei Bedarf mit 0,02M NiCl₂ intensiviert und die Farbreaktion durch mehrmaliges Spülen mit PBS gestoppt.

Vollständige Embryos wurden in 90%igem Glycerol untersucht oder in Epon eingebettet und 20µm-Schnitte angefertigt.

4.7 Iontophoretische Markierung von Zellen

Entweder wurden vollständige Embryos mit Hilfe von entomologischen Nadeln, mit der dorsalen Seite nach oben, auf mit Silgard[®] überzogenen Objektträgern befestigt oder Agarose-Schnitte mit 70µm einzeln auf Glasobjektträger gezogen (4.2.2.2). Um die Schnitte zu befestigen, wurden diese mit PBS auf die Objektträger gelegt und das PBS mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Wenn die Ränder der Schnitte leicht angetrocknet waren, wurde das Präparat erneut mit PBS abgedeckt und mit einem Deckgläschen geschützt, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern.

Die Farbstoffinjektion von Lucifer Yellow (LuY) bzw. die Applikation von Diocadecyltetramethylindocarbocyanin (DiI) erfolgte unter einem Langdistanz-Wasser-Immersion-Objektiv von Leica mit einer 50fachen Vergrößerung. Das Objektiv war fest an einem Zeiss-Mikroskop montiert.

Die Zellen wurden mit dünnwandigen Glaspipetten, die einen Widerstand von 10-20MΩ aufwiesen, vorsichtig perforiert und iontophoretisch mit 2%igem LuY, gelöst in 2M Lithiumacetat, gefüllt. Mit konstantem hyperpolarisierendem Strom erfolgte über fünf Minuten die Farbstoffinjektion langsam über die Perforationspipette. DiI wurde in einer Konzentration von 0,5% (gelöst in Dimethylformamid DMF) extrazellulär appliziert. DiI ist lipidlöslich und gelangt durch die Zellmembran in das Zellinnere. DiI kann nur über direkte Kontaktstellen bzw. „gap junctions“ übertragen werden, nicht jedoch über chemische Synapsen. Somit können durch DiI auch morphologisch gekoppelte oder über „gap junctions“ gekoppelte Zellen markiert werden.

Die Schnitte wurden entweder sofort nach der Färbung für 45 Minuten mit 2%igem Formaldehyd fixiert, kräftig gewaschen und in 90%igem Glycerol in PBS zur optischen Untersuchung eingebracht oder mit PIPES-FA 30 Minuten fixiert, mit 5%igem FCS in 0,4%igem PBT präinkubiert und mit einem PO-konjugierten sekundären Antikörper für zwölf Stunden bei 4°C behandelt (Tabelle 4). Nach Waschen in PBS wurde wie in 4.3. beschrieben mit dem DAB-Tabletten-System gefärbt, in Glycerol geklärt, in Epon eingebettet, geschnitten (vgl. 4.2.2.1) und eingedeckelt (siehe 4.2.3).

Farbstoff	Quelle	Wirt	2. Antikörper
Lucifer Yellow	Molecular Probes	Maus	GAM-PO (1:50)
DiI	Molecular Probes	Maus	GAM-PO (1:50)

Tabelle 4: Iontophoretische Markierung.

4.8 Imaging

In dieser Arbeit fanden verschiedene bildgebende Verfahren Verwendung. Mit Hilfe unterschiedlicher mikroskopischer Methoden und digitalen Bildaufnahmen wurden die Ergebnisse von Immunfärbungen und direkten Färbungen in präparierten Gehirnschnitten sichtbar gemacht. Des Weiteren wurden diese Bilder vermessen und 3D-Datensätze errechnet, um Schnittbilder und Schnittbildserien des Gehirns der *Schistocerca gregaria* zu erstellen. Die 3D-Rekonstruktionen des Zentralkomplexes und einzelner Nervenzellen konnten mittels entsprechender Software aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet bzw. animiert werden.

4.8.1 Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Histologische Gehirnschnitte wurden mit den Licht- und Fluoreszenzmikroskopen B4000 oder DM5000B von Leica gesichtet und darüber Bilder mit einer 4 Megapixel-Digitalkamera von Canon bzw. einer 1,3 Megapixel Charge-coupled Device (CCD)-Kamera von Scion Corporation aufgenommen.

4.8.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie von injizierten Zellen wurde nach der Methode von Sandell und Masland (1988) durchgeführt. Lucifer Yellow wurde zuerst, wie in 4.7 beschrieben, in die Zellen gebracht. Um den elektronendichten Zustand zu ermöglichen, wurde anschließend eine Fotokonversion von Lucifer Yellow durchgeführt, indem die gefärbte Zelle in Anwesenheit von DAB für 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt wurde. Die Präparate wurden danach mehrfach in PBS gewaschen und anschließend für die konventionelle Elektronenmikroskopie aufbereitet. Die Elektronenmikroskopie erfolgte im Institut für Zoologie der Universität Basel in der Arbeitsgruppe Prof. Reichert (siehe auch Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 2001; Boyan et al., 2004).

4.8.3 Konfokalmikroskopie

Vollständige Embryos wurden mit einem TCS SP Konfokalmikroskop der Firma Leica untersucht. Zum Einsatz kamen das Trockenobjektiv Plan-Fluotar 20/0.5NA und Ölimmersionsobjektive mit 25facher und 63facher Vergrößerung. Die Fluorochrome wurden mit einem Argonlaser angeregt und damit sichtbar gemacht. Die Anregungswellenlänge des Lasers betrug 488nm für FITC- und Alexa-Antikörper und 514nm bzw. 535nm für TRITC- und Cy3-Antikörper (Tabelle 5). Um Doppelfärbungen sichtbar zu machen, wurden Rot-Grün-Filter und unterschiedliche Kombinationen von Lichtintensitäten verwendet.

2. Antikörper	Emission, Wellenlänge
GAM-Cy3	535nm
GAR-Alexa-488	488nm
GAR-FITC	488nm
GAM-FITC	488nm
GAR-TRITC	514nm

Tabelle 5: Anregungswellenlängen der sekundären Antikörper.

4.8.4 Verwendete Bildverarbeitungsprogramme

Bilder von histologischen Gehirnschnitten wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop Elements™ 3.0 bearbeitet.

Zur Erstellung eines 3D-Modells der protocerberalen Neuroblasten wurde die Software Rotater 5.3[®] (C. Kloeden) verwendet, zur Rotation dieses Modells Qicktime[™].

Die einzelnen Konfokalbilder von vollständigen Embryonen und histologischen Schnitten wurden mit einer CCD-Chip-Videokamera digitalisiert, die mit einer frame-grabber-card von Scion Corporation verbunden war. Mit Hilfe der Software Visicapture[®] von Scion Corporation wurden die Bilder in eine fortlaufende Bildfolge gebracht. Die Weiterverarbeitung der fortlaufenden Bildfolge zu den benötigten 3D-Modellen der Embryonenaufnahmen erfolgte mit der Public Domain Software ImageJ, die der Schnitte mit der Public Domain Software Image-SXM.

Mit der Software Auto-CAD 2009 Testversion wurde die Abbildung 56 erstellt.

4.9 Neuralachsen

Wie Abbildung 9 zeigt, kommt es während der Embryonalentwicklung zu einem massiven neuronalen Wachstum und Umbau in der Kopfkapsel. Diese Entwicklung erfordert, wie erläutert, die Einordnung von morphologischen Strukturen bezogen auf Neuralachsen statt auf Körperachsen. Die Oberseite des Gehirns entspricht auf die Neuralachsen bezogen anterior, die Vorderseite des Gehirns ventral, die Hinterseite des Gehirns dorsal und die Basis des Gehirns posterior. In dieser Arbeit beziehen sich sämtliche Achsenbezeichnungen in den Abbildungen und im Text auf die Neuralachsen, nicht wie bislang in der Biologie üblich auf die Körperachsen.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Erstellung einer neuen, topologischen Karte der Gehirnneuroblasten der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* und der zeitliche Ablauf der Entwicklung der Protocerebrumneuroblasten beschrieben, die an der Bildung der Trakte des Zentralkörpers beteiligt sind. Des Weiteren wird die Entwicklung folgender Pionierneuronen dargestellt:

- Laterale Zellen
- primäre Pioniere der protocerebralen Kommissur
- sekundäre Pioniere der protocerebralen Kommissur.

Die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur bilden die erste neuronale Überquerung der Gehirnmittellinie. Abbildung 54 zeigt die Bildung der protocerebralen Kommissur: Die LCs senden ihre Axone zuerst Richtung PCPs und anschließend Richtung SCNs. Die SCNs faszikulieren mit den LCs und zusammen mit den PCPs bilden diese Zellen die protocerebrale Kommissur (Boyan et al., 2003). Diese bildet mit anderen Zellen ein Grundgerüst, das bei der Entwicklung von Gehirnneuropilen als Leitstruktur funktioniert. Abschließende Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das Auftreten von Botenstoffen in der Embryogenese, der larvalen und adulten Entwicklung sowie Expressionsmuster verschiedener Neuromodulatoren im Gehirn von *Schistocerca gregaria*.

5.1 Neuroarchitektur der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte des Zentralkomplexes von *Schistocerca gregaria*

Zur Beschreibung der embryonalen Entwicklung der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte müssen zuerst die an deren Entwicklung beteiligten Neuroblasten identifiziert werden. Anschließend müssen die Entwicklungslinien der identifizierten Neuroblasten nachvollzogen werden.

5.1.1 Neuronale Organisation des Zentralkomplexes in der adulten Heuschrecke

Der Zentralkomplex ist die größte neuroanatomische Struktur des Mittelhirns der adulten Heuschrecke, bestehend aus protocerebraler Brücke, Zentralkörper, ellipsoidem Körper, Noduli und den akzessorischen Loben. Die adulte Struktur mit ihren vertikalen und horizontalen Schichtungen wurde bereits umfassend beschrieben (Williams, 1975; Homberg, 1991; Vitzthum et al., 1996; Loesel et al., 2002), nicht jedoch die embryonale Struktur und

die embryonale Entwicklung des modularen Aufbaus des Zentralkörpers. Auffällig sind die axonalen Projektionen aus der Pars intercerebralis, die über die protocerebrale Brücke die *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte bilden (Williams, 1975). Der säulenartige Aufbau wird durch die Expressionsmuster von verschiedenen Neuromodulatoren wie Serotonin und Allatostatin besonders deutlich (Homberg, 1994, 2002) und ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.


Bei 85% der Embryogenese zeigt eine Diaphorasefärbung bereits weitgehend das adulte Aussehen des Zentralkörpers mit den Trakten *w*, *x*, *y* und *z* (Abbildung 4). Das heißt, dass sich der modulare Aufbau des Zentralkomplexes während der embryonalen Entwicklung bildet. Die Beschreibung der Entwicklung dieser Trakte aus Neuroblasten im Heuschreckenembryo ist Gegenstand dieses Abschnittes der Arbeit.

5.1.2 Organisation der protocerebralen Neuroblasten im frühen Embryogehirn

Um die Ontogenie der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte des Zentralkomplexes untersuchen zu können, müssen zuerst die Neuroblasten identifiziert werden, deren Nachkommen die entsprechenden axonalen Projektionen dieser Trakte generieren. Dazu ist eine Revision und Präzisierung der ursprünglichen Neuroblastenkarte (Abbildung 8) von Zacharias et al. (1993) notwendig. Diese neue Karte beschreibt die Lage der Neuroblasten in Bezug zu adulten Hirnstrukturen wie den optischen Loben und den Pilzkörpern. Die topologische Einordnung orientiert sich an den Neuralachsen. Zur Identifizierung der am Aufbau der Trakte beteiligten Neuroblasten ist es zusätzlich notwendig, die Neuroblasten den entsprechenden Gehirnteilen Protocerebrum, Tritocerebrum und Deutocerebrum zu zuordnen. Bei vergangenen Untersuchungen wurden keine molekularen Beweise für Segmentgrenzen berücksichtigt, und somit möglicherweise Neuroblasten unterschiedlich zu den jetzt vorliegenden Erkenntnissen zugeordnet. Segmentgrenzen werden z.B. durch das Gen *engrailed* festgelegt. Engrailed-Expression zeigt sich im posterioren Kompartiment jeden Segments. Diese posterioren Zellen werden dem Segment als dessen Grenze zugeordnet (Patel et al., 1989).

Die mediane Domäne dehnt sich über das gesamte zentrale Nervensystem aus: von posterior (Terminalganglion) nach anterior (Gehirn) und innerhalb der Ganglien von ventral nach dorsal. Im Gehirn ist die mediane Domäne in der frühen Embryogenese durch eine Barriere aus Reg-1-exprimierenden Gliazellen von den protocerebralen Hemisphären getrennt (Boyan et al., 1995a, b). Im Laufe der Embryonalentwicklung bricht diese Barriere zusammen, so dass die Abkömmlinge der W-, X-, Y- und Z-Neuroblasten in das Mittelhirn gelangen können

und einen Teil der adulten Pars intercerebralis bilden (Williams, 1975; Boyan et al., 1995b; Ludwig et al., 2002). Um die protocerebrumeigenen Grenzen zu berücksichtigen, wurde mit Hilfe von Engrailed-Antikörperfärbungen eine Neuroblastenkarte des embryonalen Protocerebrums der Heuschrecke erstellt.

In der frühen Embryonalentwicklung (27%) zeigt die Expression von Engrailed klar definierte Streifen an den posterioren Grenzen des mandibularen (S1) und des tritocerebralen (TC) Segments. Außerdem wird eine Engrailed-exprimierende Zellgruppe am posterioren Ende des Deutocerebrums gezeigt. Diese Expression zieht anterior in die Antennalloben (Abbildung 18). An der Grenze des Protocerebrums zum Deutocerebrum befindet sich eine große Engrailed-positive Zellgruppe. Die Zellgruppe erstreckt sich zwischen den Antennalloben, den optischen Loben und anterior-medial Richtung Mittellinie. Die Zellgruppe zeigt keinerlei Verbindung zu den sie umgebenden Loben (Abbildung 18 )

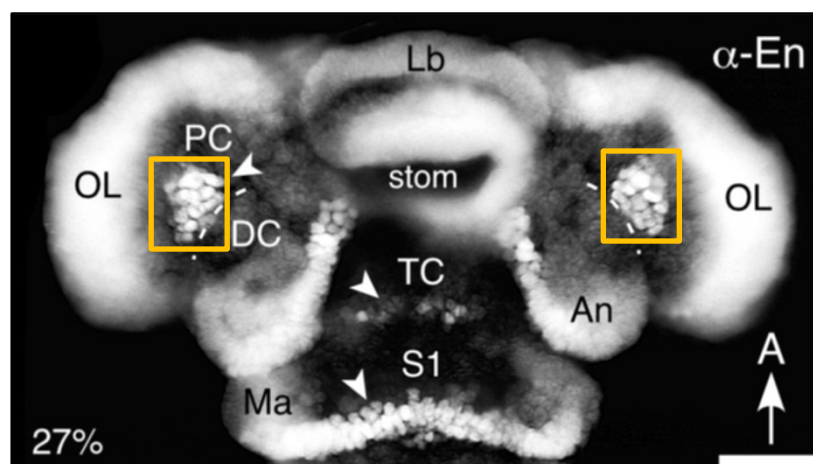






Abbildung 18: Kopf eines Heuschreckenembryos bei 27% der Embryonalentwicklung.
Maßstab: 150µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110. Verändert.

Erklärungen zu Abbildung 18:

Die Färbung zeigt Engrailed-Expression.

 posteriore Segmentgrenzen.  Engrailed positive Neuroblasten (schematische Darstellung in Abbildung 19 und Abbildung 20).  Grenze zwischen Protocerebrum und Deutocerebrum.  zeigt nach anterior.

Abkürzungen in Abbildung 18:

Lb Labrum. En *engrailed*. PC Protocerebrum. OL optischer Lobus. stom Stomodeum. DC Deutocerebrum. TC Tritocerebrum. S1 mandibulares Segment. An Antenne. Ma Mandibel. A anterior.

Die neue Karte der protocerebralen Neuroblasten entstand mittels Rekonstruktionen serieller Schnitte von Osmiumtetroxid-Ethylgallat-gefärbten Präparaten (nach Wigglesworth, siehe 4.4.1) aus Heuschreckengehirnen bei 33% und 47% der Embryogenese. Diese Abbildungen

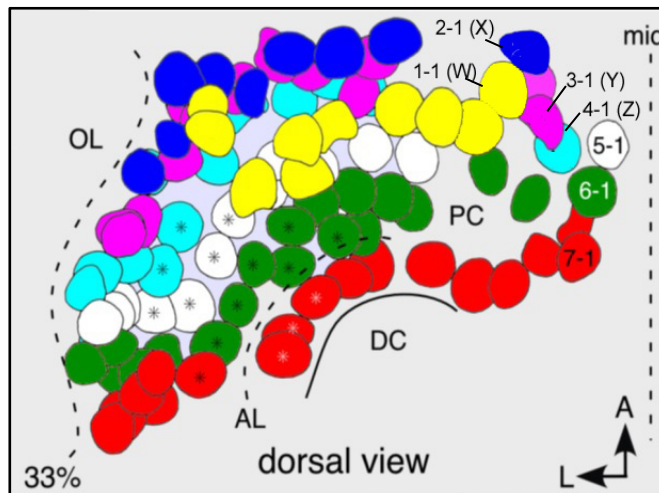
wurden mit der Abbildung 18 (Engrailed-Expression) verglichen. Da *engrailed* posteriore Kompartimente von Segmenten und damit posteriore Neuroblasten definiert, begrenzt die letzte gefärbte Neuroblastenreihe posterior das Protocerebrum.

Die Gehirnschnitte zeigen eine mit unregelmäßigen Abständen gekrümmte Anordnung der protocerebralen Neuroblasten. Die Hohlräume zwischen den Neuroblasten sind keine Fixier- oder Präparierartefakte, sondern werden in der späteren Embryonalentwicklung durch Neuropile wie den Pilzkörpern ausgefüllt (Boyan und Williams, 1997). Da Abbildungen nur den zweidimensionalen Eindruck vermitteln können, somit die Zwischenräume und Anordnungen der Neuroblasten nicht ausreichend erkennen lassen, wurde mit Hilfe einer Software eine 3D-Rekonstruktion der Neuroblasten im Protocerebrum erstellt.

Die Analyse der 3D-Rekonstruktion beginnt an der Engrailed-exprimierenden, posterioren Reihe und endet an der anterioren Neuroblastenreihe. Die Neuroblasten wurden gezählt und analog dem ventralen Bauchmark (Doe und Goodman, 1985a) zu Gruppen zugeordnet. Bei 33% der Embryonalentwicklung konnten 95 Neuroblasten gefunden und diese sieben Reihen zugeordnet werden. Boyan und Williams ordneten 2008 dem Protocerebrum 96 Neuroblasten zu. Dieses Ergebnis wird in der Diskussion näher betrachtet. Die Abbildung 19 und Abbildung 20 geben das dreidimensionale Modell der Reihen der protocerebralen Neuroblasten als zweidimensionales Schema wieder. Die Reihen beschreiben durch die Krümmung der Gehirnhemisphäre einen dorso-posterioren Bogen der in den Abbildung 21 bis Abbildung 23 durch verschiedene Blickrichtungen verdeutlicht wird.

Als wichtigste Erkenntnis ist festzuhalten: Dem Protocerebrum können zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Untersuchung 95 Neuroblasten angeordnet in sieben Reihen, von anterior nach posterior gruppiert, zugeordnet werden (Abbildung 19, Abbildung 20). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass durch Ergebnisse weiterer Untersuchungen, z.B. auf molekularer Ebene, die Zuordnung neu überdacht werden muss.

Nach der Zuordnung der 95 Neuroblasten zu den sieben Reihen mussten diese einzeln bezeichnet werden. Die Reihen der Neuroblasten (Abbildung 19, Abbildung 20) wurden wie bei Doe und Goodman für das Bauchmark beschrieben (1985a), durchnummeriert (Tabelle 6) und farbcodiert (Abbildung 19). Die Neuroblasten wurden nach dem Muster Zahl-Zahl bezeichnet.



Abkürzungen in Abbildung 19:

mid Mittellinie.

OL optischer Lobus.

PC Protocerebrum.

DC Deutocerebrum.

AL Antennallobus.

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

A anterior. L lateral.

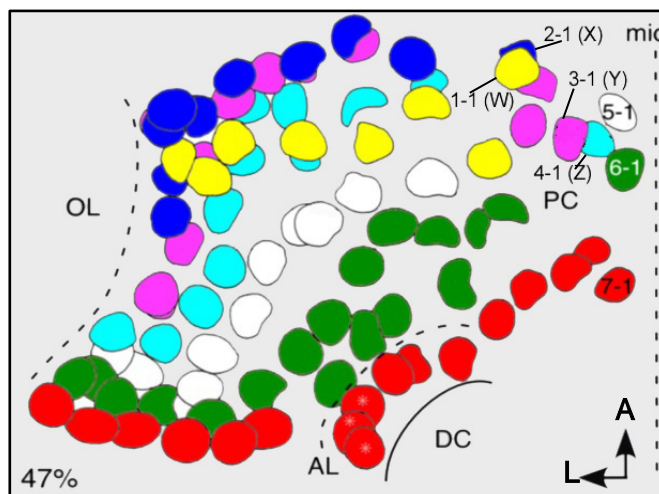
Abbildung 19: Organisation von protocerebralen Neuroblasten bei 33% der Embryonalentwicklung.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Ausführungen zu Abbildung 19:

Zu sehen ist eine, aus seriellen Schnitten, rekonstruierte Karte der protocerebralen Neuroblasten bei 33% der Embryonalentwicklung (dorsal view = Blickrichtung dorsal). Die Neuroblasten werden in sieben Reihen organisiert (farbliche Kodierung von anterior nach posterior: gelb, blau, pink, türkis, weiß, grün, rot). Die Nummerierung erfolgt von medial nach lateral.

* Engrailed-positive Neuroblasten des PC (entsprechend Abbildung 18).

--- Grenze optischer Lobus Protocerebrum. --- Grenze Protocerebrum Antennallobus. (Grenze Protocerebrum Deutocerebrum. * Engrailed-positive Neuroblasten, die in der weiteren Entwicklung in den Antennalloben integriert werden. | Mittellinie. ↑ zeigt nach anterior. ← zeigt nach lateral.



Abkürzungen in Abbildung 20:

OL Optischer Lobus.

PC Protocerebrum.

AL Antennallobus.

DC Deutocerebrum.

mid Mittellinie.

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

A anterior. L lateral.

Abbildung 20: Organisation von protocerebralen Neuroblasten bei 47% der Embryonalentwicklung.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Ausführungen zu Abbildung 20:

Zu sehen ist eine, aus seriellen Schnitten, rekonstruierte Karte der protocerebralen Neuroblasten bei 47% der Embryonalentwicklung. Farbkodierung identisch wie in Abbildung 19. Im Vergleich zu Abbildung 19 zeigt sich im Protocerebrum keine Engrailed-Expression.

--- Grenze optischer Lobus Protocerebrum. --- Grenze Protocerebrum Antennallobus. (Grenze Protocerebrum Deutocerebrum. | Mittellinie. ↑ zeigt nach anterior. ← zeigt nach lateral.

Die erste Zahl beschreibt die Reihennummer, die von anterior nach posterior durchnummeriert wurden, die zweite Zahl die Lage der Neuroblasten, die von medial nach lateral

durchgezählt wurden (im Heuschreckengehirn von der Mittellinie Richtung optische Loben). Die beschriebene Vorgehensweise wurde bei 33%, 37% und 47% der Embryonalentwicklung angewandt und erbrachte jeweils die gleichen Ergebnisse (Gesamtzahl 95 NBs, sieben Reihen). Ein Vergleich der Neuroblastenkarten bei 33% der Embryonalentwicklung (Abbildung 19) und 47% der Embryogenese (Abbildung 20) zeigt jeweils dieselben Neuroblasten, die jedoch auseinander gedriftet sind. Dieses Auseinanderdriften entsteht durch die Platzbeanspruchung der Nachkommen der Neuroblasten und durch die Entwicklung anderer neuropilärer Regionen wie den Pilzkörpern.

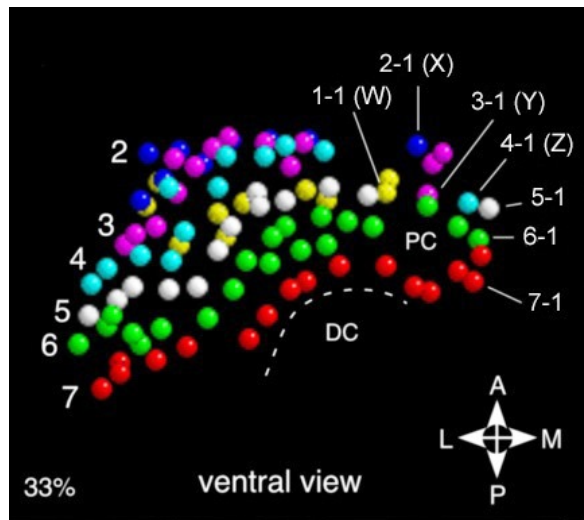
Reihe	Zahl an Neuroblasten	Bezeichnungen
1	10	1-1 (W), 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10
2	9	2-1 (X), 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9
3	14	3-1 (Y), 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14
4	12	4-1 (Z), 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12
5	13	5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 5-11, 5-12, 5-13
6	20	6-1, 6-2, 6-3, 6-4, 6-5, 6-6, 6-7, 6-8, 6-9, 6-10, 6-11, 6-12, 6-13, 6-14, 6-15, 6-16, 6-17, 6-18, 6-19, 6-20
7	17	7-1, 7-2, 7-3, 7-4, 7-5, 7-6, 7-7, 7-8, 7-9, 7-10, 7-11, 7-12, 7-13, 7-14, 7-15, 7-16, 7-17

Tabelle 6: Zuordnung der Neuroblasten des Protocerebrums in Reihen und ihre Bezeichnungen.

Zu erwähnen ist, dass die Engrailed-Expression bei 47% der Embryonalentwicklung im Epithelium des Protocerebrums nachweisbar ist, jedoch nicht in protocerebralen Neuroblasten und Neuronen. Die protocerebrale Expression von Engrailed erfolgt während der Embryogenese dynamisch. Sie beginnt bei 22% der Embryonalentwicklung, erreicht bei 25 bis 26% ihr Maximum und verringert sich bis 30% der Embryogenese auf wenige Zellen (Boyan und Williams, 2002).

Um die Topologie der Neuroblasten genau zu erkennen, wurde ein virtuelles rotierendes 3D-Modell mit der Software Rotater 5.3[©] (C. Kloeden) angefertigt. Dazu wurde bei 33% der Embryogenese von jedem Neuroblasten die genaue Position in Bezug zu einem dreidimensionalen Koordinatensystem (x, y, z) gemessen, dessen Nullpunkt ein Referenzpunkt im posterioren Mittelgehirn bildet. Die ermittelten Koordinaten wurden als Textdatei in die Software importiert. Mit der Software Quicktime[™] konnte das daraus resultierende

Modell in alle Richtungen bewegt werden. Zudem erlaubte dieses Programm die Fokussierung und Vergrößerung jeder Position.



Abkürzungen in Abbildung 21

2, 3, 4, 5, 6, 7 Neuroblastenreihe .

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

PC Protocerebrum.

--- Grenze Protocerebrum Deutocerebrum.

DC Deutocerebrum.

↑ A anterior. → M medial.

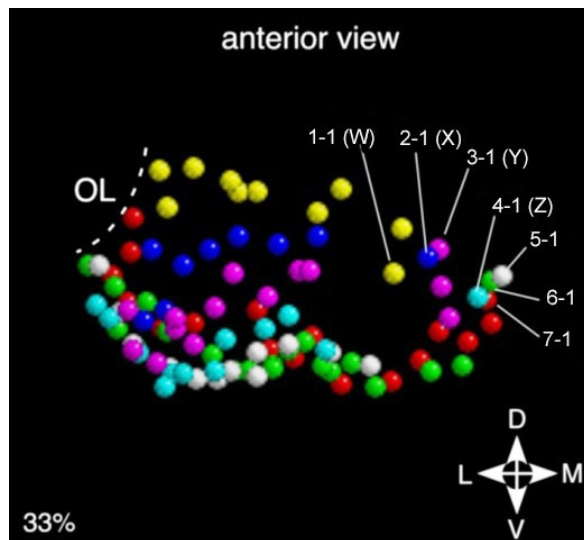
↓ P posterior. ← L lateral.

Abbildung 21: 3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryogenese.

Ventrale Ansicht.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).

Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.



Abkürzungen in Abbildung 22:

OL Optischer Lobus.

--- Grenze optischer Lobus Protocerebrum.

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

↑ D dorsal. → M medial.

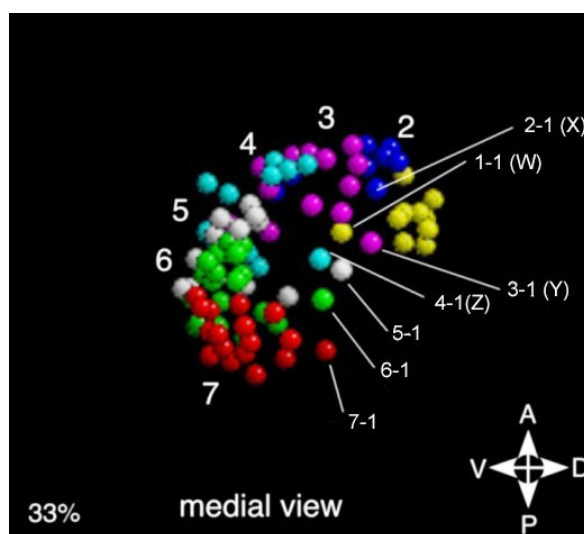
→ V ventral. ↓ L lateral.

Abbildung 22: 3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryogenese.

Anteriore Ansicht.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).

Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.



Abkürzungen in Abbildung 23:

2, 3, 4, 5, 6, 7 Neuroblastenreihe

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

↑ A anterior. → D dorsal.

↓ P posterior. ← V ventral.

Abbildung 23: 3D-Modell von Neuroblasten bei 33% Embryonalentwicklung.

Mediale Ansicht.

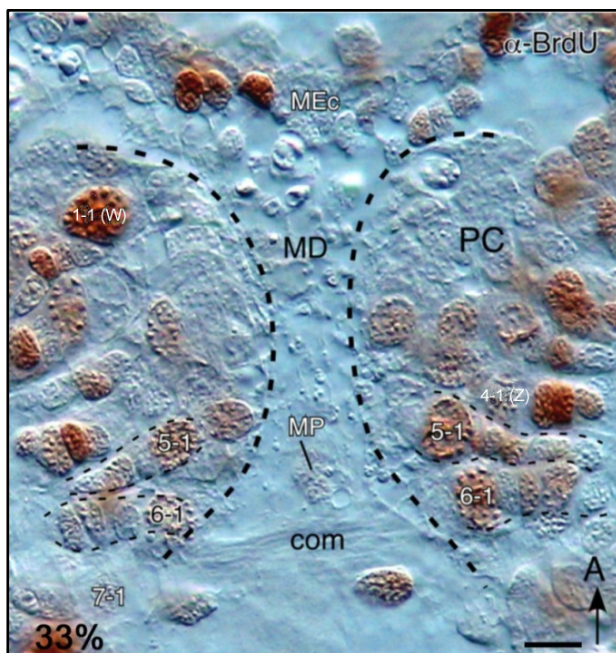
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).

Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Trotz der nur schematischen Darstellung der Neuroblasten, die tatsächliche Form und Größe konnten vom Programm nur begrenzt verarbeitet werden, gelang es durch entsprechende Drehungen jeden der 95 Neuroblasten einer Hemisphäre in Bezug zu einander zu betrachten (Lokalisation, Abstand). Das 3D-Modell wird in den Abbildung 21 bis Abbildung 23 mit denselben Farbcodierungen, wie in den Abbildung 19 und Abbildung 20, gezeigt.

5.1.3 Identifizierte Neuroblasten und ihre Entwicklungslinien im embryonalen Protocerebrum

Um die Ontogenie der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte untersuchen zu können, ist nicht nur die Identifizierung der Neuroblasten notwendig, sondern auch das Erkennen ihrer Entwicklungslinien. Die Entwicklungslinien einiger identifizierter Neuroblasten wurden durch BrdU-Einlagerungs-Experimente sichtbar gemacht und sind in Abbildung 24 dargestellt.



Erläuterung zu Abbildung 24:

Mikroskopische Aufnahme mit Differentialinterferenzkontrast. Mitotisch aktive Zellen erscheinen braun.

- - - Grenze des Protocerebrum.

- - - Entwicklungslinien der Neuroblasten 5-1 und 6-1 (Nummerierung der Neuroblasten wie im Text beschrieben).

↑ zeigt nach anterior.

Abbildung 24: Identifizierte Neuroblasten und ihre Entwicklungslinien im PC bei 33% der Embryogenese.

Maßstab: 25µm.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Abkürzungen in Abbildung 24:

BrdU Bromdesoxuridin.

PC Protocerebrale Hemisphäre.

MEc mesektodermales Epithelium.

MD mediane Domäne.

MP mediane Vorläuferzellen.

com Kommissur.

A anterior.

Erklärungen zu Abbildung 25:

--- Entwicklungslinie des Neuroblasten 7-1 mit Ganglionmutterzelle ★ und Nachkommen * bei 33% der Embryonalentwicklung.

Abkürzung in Abbildung 25:

Wigg Wigglesworth-Färbung.

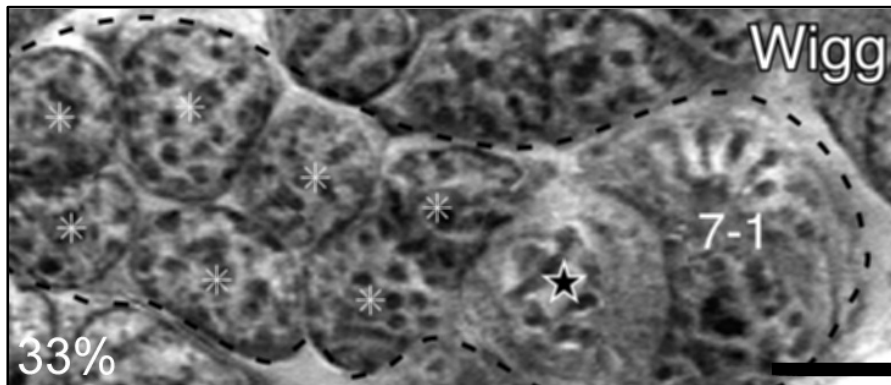


Abbildung 25: Wigglesworth-Färbung der Entwicklungslinie des Neuroblasten 7-1.
Maßstab: 10µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110.
verändert.

Ausführungen zu Abbildung 26:

--- Entwicklungslinie des Neuroblasten 7-1 mit Hüllzellen ★. Ganglionmutterzellen ★, die eine schwache BrdU-Färbung zeigen und Nachkommen * bei 33% der Embryonalentwicklung.

Abkürzung in Abbildung 26:

BrdU Bromdesoxyuridin.

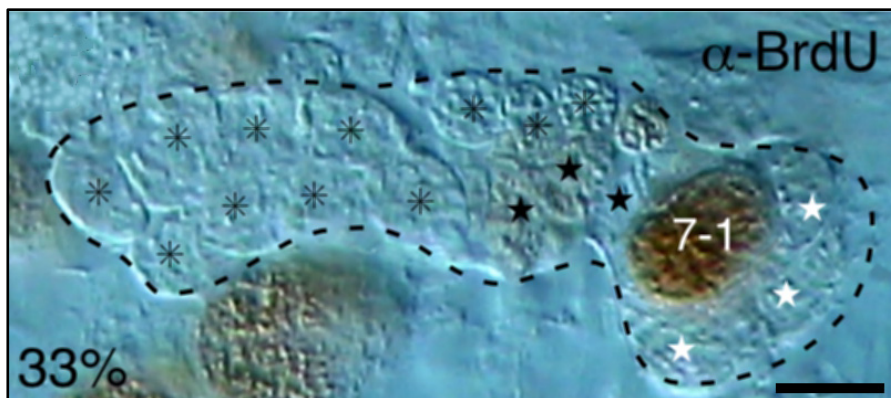


Abbildung 26: BrdU-Einlagerung im PC bei 33% der Embryogenese.
Maßstab: 10µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110.
verändert.

Erläuterungen zu Abbildung 27:

33% der Embryonalentwicklung. Farbstoffkopplung zeigt sich nur bei den Nachkommen des Neuroblasten 7-1.

Abkürzung in Abbildung 27:

LuY Lucifer Yellow.

★ Ganglionmutterzellen. * Nachkommen der Ganglionmutterzellen.

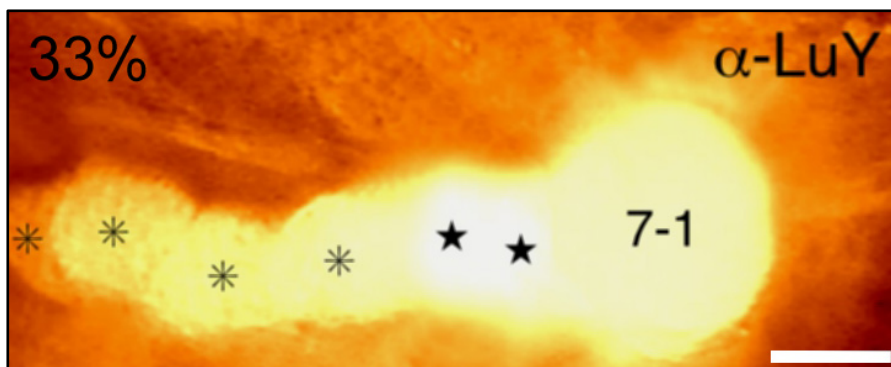
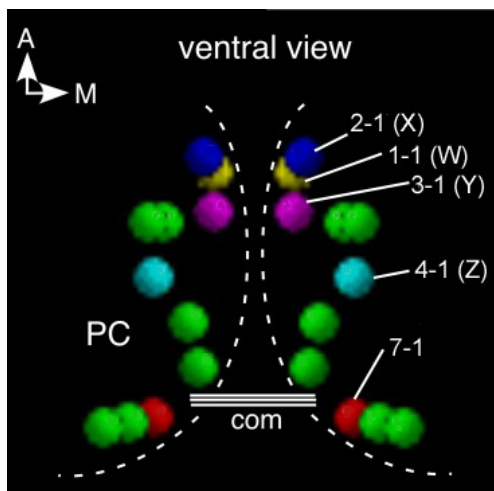


Abbildung 27: Intrazelluläre Injektion des Neuroblasten 7-1 mit Lucifer Yellow.
Maßstab: 10µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110.
verändert.

In dieser Arbeit wird beispielhaft die Entwicklungslinie des Neuroblasten 7-1 mit der Wigglesworth-Färbung (Abbildung 25), BrdU-Einlagerung (Abbildung 26) und der intrazellulären Färbung mit LuY (Abbildung 27) aufgezeigt.

Die Wigglesworth-Färbung (Abbildung 25) zeigt eine säulenartige Anordnung der Nachkommen der Neuroblasten. Diese Kolumnen orientieren sich stereotyp im Gehirn. Die Orientierung dieser Säulen hängt von der Lage ihres zugehörigen Neuroblasten ab. In späteren Entwicklungsstadien zeigen sich große Zellgruppen, die mit protocerebralen Neuroblasten assoziiert sind, welche an der Bildung des Zentralkomplexes beteiligt sind.



Erklärungen zu Abbildung 28:

↑ zeigt nach anterior. → zeigt nach medial.

33% der Embryonalentwicklung. Ventrale Ansicht.

--- mediale Grenze des Protocerebrums.

Abkürzungen in Abbildung 28:

A anterior. M medial.

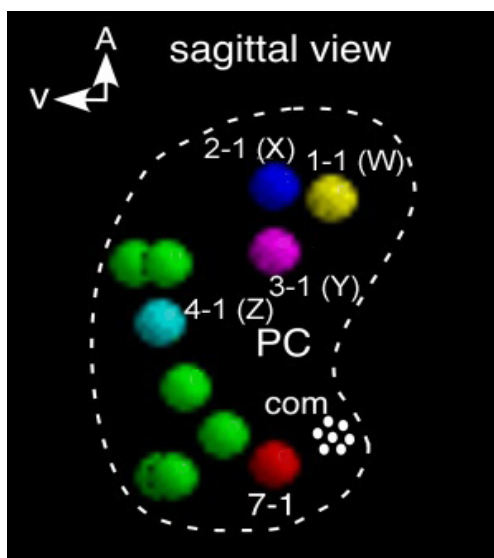
1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

7-1 Neuroblast.

PC Protocerebrum. com Kommissur. Nummerierung der Neuroblasten wie im Text beschrieben.

Abbildung 28: Computer-generiertes 3D-Modell der an der Bildung der w-, x-, y- und z-Trakte beteiligten protocerebralen Neuroblasten. Ventrale Ansicht.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.



Erklärungen zu Abbildung 29:

↑ zeigt nach anterior. ← zeigt nach ventral.

33% der Embryogenese. Sagittale Ansicht.

--- Grenzen des Protocerebrums.

▣ Kommissur.

Nummerierung der Neuroblasten wie im Text beschrieben.

Abkürzungen in Abbildung 29:

A anterior. V ventral.

1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

7-1 Neuroblast.

PC Protocerebrum. com Kommissur.

Abbildung 29: Computer-generiertes 3D-Modell der an der Bildung der w-, x-, y- und z-Trakte beteiligten protocerebralen Neuroblasten. Sagittale Ansicht.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Die Methoden der BrdU-Einlagerung und LuY-Injektion zeigen für den Neuroblasten 7-1 vergleichbare Ergebnisse:

- die Richtung und die Form der sich entwickelnden Säule sind identisch
- spezifische Zellen wie die Ganglionmutterzellen sind über Größe und Form identifizierbar
- die Anzahl der Nachkommenzellen ist bei allen drei Untersuchungsmethoden gleich.

Mit den kombinierten Ergebnissen der drei Untersuchungsmethoden konnte die Entwicklung der Zentralkörperneuroblasten und ihrer Linien zwischen 33% und 37% der Embryonalentwicklung aufgezeigt werden:

- In dieser Entwicklungsphase entstehen aus den NBs und deren Nachkommen Zellgruppen, aus denen die ersten axonalen Projektionen entstehen.
- Diese Projektionen bilden Nervenfaserbündel, die zu den *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakten werden. Zu den einzelnen Trakten kann der jeweilige ursprüngliche Neuroblast zugeordnet werden (Abbildung 28, Abbildung 29):
 - ♦ Neuroblast 1-1 generiert die W-Zellgruppe
 - ♦ Neuroblast 2-1 generiert die X-Zellgruppe
 - ♦ Neuroblast 3-1 generiert die Y-Zellgruppe
 - ♦ Neuroblast 4-1 generiert die Z-Zellgruppe.

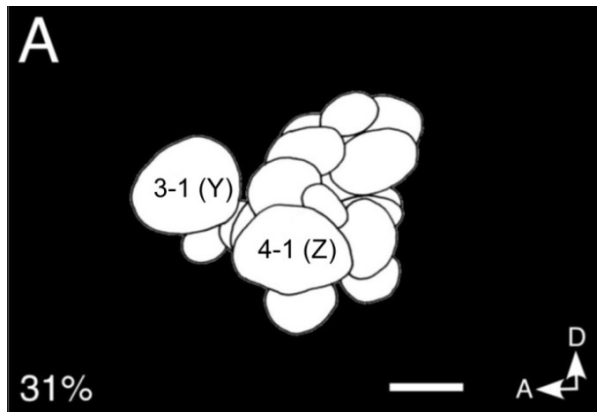
Ein 3D-Modell einiger protocerebraler Neuroblasten zeigt, dass diese NBs jeweils die ersten einer Reihe und direkt an der Mittellinie gelegen sind (Abbildung 28). Die Neuroblasten 1-1 (W), 2-1 (X) und 3-1 (Y) sind gruppiert, der Neuroblast 4-1 (Z) liegt einzeln und ventraler (Abbildung 29).

5.1.4 Entwicklung der *z*-Trakt-bildenden Neuroblastenlinie im Zentralkomplex

Für die weitere, detailliertere Untersuchung wurde der Neuroblast 4-1 (Z) ausgewählt und seine Entwicklungslinie zur Z-Zellgruppe über einen Zeitraum von 20% der Embryonalentwicklung beschrieben (Abbildung 30). Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der Entwicklung der Axonprojektionen, die den *z*-Trakt des Zentralkomplexes bilden.

Der NB 4-1 (Z) bildet seine ersten Ganglionmutterzellen bei ca. 30% der Embryonalentwicklung (Abbildung 30A). Anschließend beschreibt die Entwicklungslinie einen ventralen Knick (Abbildung 30B). Bei ca. 34% der Embryogenese bilden sich die ersten Axone, die in

den z-Trakt projizieren. Auch der y-Trakt wird bereits bei 34% pioniert. Das gleiche gilt für die anderen beiden Trakte des Zentralkomplexes (Williams und Boyan, 2008).



Angaben zu Abbildung 30:

Bild A: 31% der Embryonalentwicklung.

Der Neuroblast hat 15 Nachkommen.

Keiner der Nachkommen hat bisher in den z-Trakt projiziert.

↑ zeigt nach dorsal.

← zeigt nach anterior.

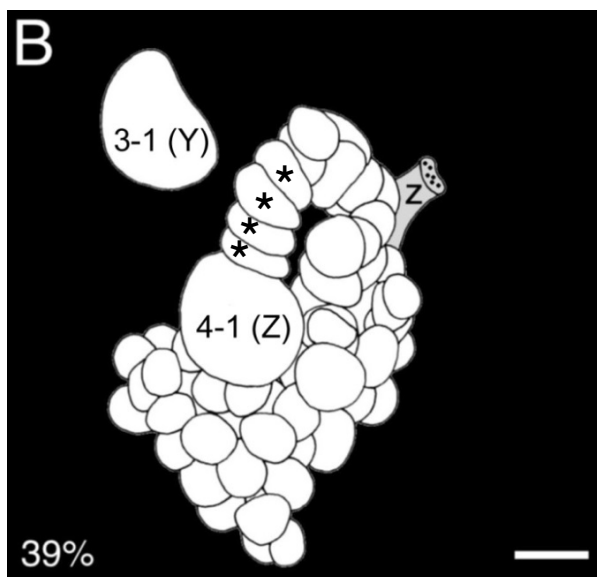


Bild B: 39% der Embryonalentwicklung.

Es bestehen bereits 50 Nachkommen des Neuroblasten 4-1.

Die ersten vier sichtbaren Zellen sind Ganglionmutterzellen.

Der z-Trakt ist erkennbar,

enthält aber weniger als zehn Fasern.

★ Ganglionmutterzelle.

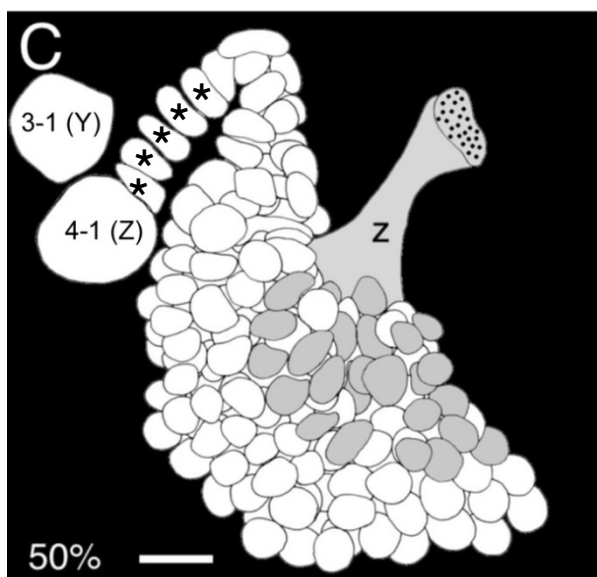


Bild C: 50% der Embryonalentwicklung.

Es befinden sich über 100 Nachkommen in der Zellgruppe.

Zellen, die in den z-Trakt projizieren sind grau unterlegt.

★ Ganglionmutterzelle.

Abkürzungen in Abbildung 30:

A anterior.

D dorsal.

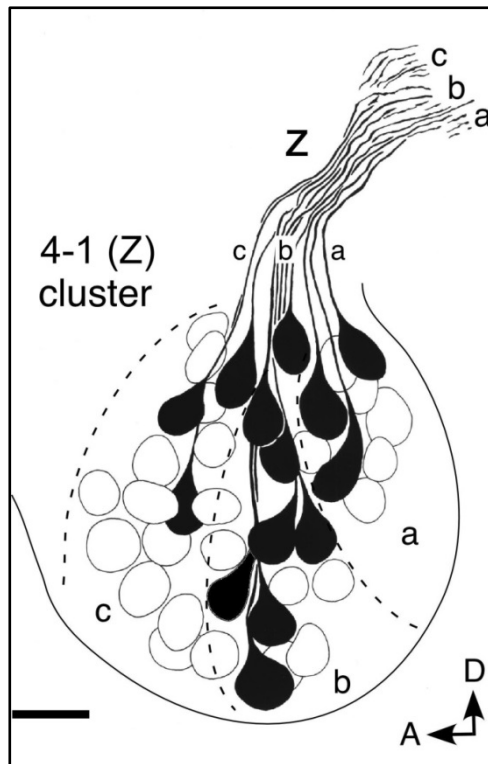
z Trakt z.

3-1 (Y), 4-1 (Z) Neuroblasten.

Abbildung 30: Entwicklungslinie der Z-Zellgruppe des Zentralkomplexes aus einer Rekonstruktion serieller Schnitte.
Maßstab: Bild A bis C 15µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110. verändert.

Zwischen 38 und 39% der Embryonalentwicklung enthält die Z-Zellgruppe ca. 17 neuronale Nachkommen. Bei 39% der Embryonalentwicklung ist unter anderem der z-Trakt durch das

Einwachsen weiterer Abkömmlinge bereits in seiner reifen Form zu erkennen. Bei 50% der Embryogenese ist es möglich, die örtliche Verteilung der Projektionen darzustellen (Abbildung 30C) und etwa 25 Zellen (grau markiert) aus einer Zellgruppe von 100 Zellen des Neuroblasten 4-1 (Z) zu identifizieren, deren Axone in den z -Trakt des Zentralkomplexes führen. Die Z-Zellgruppe nimmt eine stereotype, halbkugelförmige Form an.



Erklärungen zu Abbildung 31:

Rekonstruktion aus Serienschnitten der 4-1 (Z) Zellgruppe bei 50% der Embryonalentwicklung.

Zu sehen ist die zeitliche Abhängigkeit der Organisation der Axone des z -Traktes:

--- Hypothetische Begrenzung der Zellpopulationen a, b, c.

↑ zeigt nach dorsal.

← zeigt nach anterior.

Abkürzungen in Abbildung 31:

c, b, a Population Axone mit Zellkörper.

z Trakt z .

4-1 (Z) Zellgruppe.

D dorsal. A anterior.

Abbildung 31: Zeitliche Topologie der axonalen Projektionen in einem Trakt des Zentralkomplexes.

Maßstab: 20µm.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).

Arthropod Struct. Dev. 34, 97-110. verändert.

Bei genauerer Untersuchung dieser Axone, die aus dieser Zellgruppe in den z -Trakt projizieren (Abbildung 31), wurde erkennbar, dass die Lage des einzelnen Axons von der jeweiligen Lage seines Zellkörpers in der Z-Zellgruppe abhängt. Das neuronale Alter in einer Zellgruppe kann durch den relativen Abstand zum dazugehörigen Neuroblasten ermittelt werden: die ältesten Nachkommen haben den größten Abstand zu ihrem Neuroblasten. Für den Neuroblasten 4-1 (Z) gilt bei einer Embryonalentwicklung von 50%: die ältesten Zellkörper der Zellgruppe, die a-Population, liegen posterior-dorsal und senden ihre Axone in den am weitesten posterior liegenden Teil des z -Traktes. Die nächst Jüngeren, die b-Population, projizieren weiter anterior in den mittleren Teil des z -Traktes. Die jüngsten Axone, die c-Population, wachsen in den anterioren Teil des z -Traktes. Das altersabhängige Modell der Axonprojektionen wurde mit Daten von den 25 identifizierten Axonen erklärt. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass das Modell auch auf die anderen 75 nicht identifizierten Zellen der Z-Zellgruppe übertragen werden kann: die topologische Organisation des z -Traktes ist abhängig vom Alter der neuronalen Zellen. Durch dieses Wachstumsschema entsteht das

typische Axon-Muster des z -Traktes. Die Beobachtung von seitlich gerichteten Zellteilungen führt zu der Hypothese, dass aus verschiedenen Vorläuferzellen die a-, b-, und c-Zellpopulationen entstehen. In späteren Untersuchungen wurden die sogenannten „intermediate neural progenitors“ identifiziert, die als Ursprung dieser Zellgruppen angesehen werden (Boyan et al., 2010b). Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese der unterschiedlichen Ursprünge der Zellpopulationen. Deren wahrscheinliche Begrenzungen sind in Abbildung 31 durch gestrichelte Linien dargestellt. Auf diese Beobachtung soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

Die Axonprojektionen des Neuroblasten 4-1 (Z) wurde mit den Axonprojektionen der anderen drei Trakte (w , x , y) des Zentralkomplexes verglichen (Abbildung 32): Die morphologische Entwicklung der einzelnen Trakte erfolgt analog. Es entstehen Fasergruppen mit vergleichbar vielen und ähnlich großen Axonen, die sich in entsprechenden Lagen der Zellgruppen bilden. Williams hat 1975 anhand von histologischen Daten die Hypothese aufgestellt: Die Zellgruppen W, X, Y, und Z sind homolog. Dies führt zu der Annahme, dass die zeitlich abhängige Organisation des z -Traktes auch in den anderen Zellgruppen (W, X, Y) bzw. Trakten (w , x , y) stattfindet.

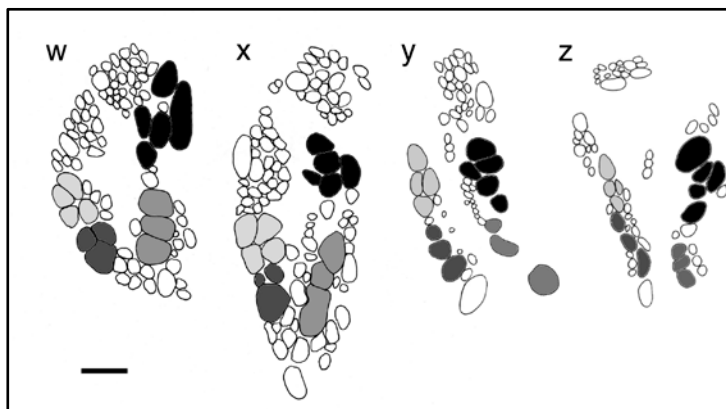


Abbildung 32: Zellgruppen W, X, Y, Z des adulten Zentralkomplexes.
Maßstab: 10µm.
Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Struct Dev 34, 97-110.

Ausführungen zu Abbildung 32:

Die Fasermuster der w -, x -, y - und z -Trakte zeigen eine Neuroarchitektur, die auf sich wiederholende Module aufbaut. Fasergruppen, die sich in der Größe, Lage, Anzahl und im Ursprung ähneln, sind mit derselben Farbmarkierung gekennzeichnet (weiß bis schwarz).

Abkürzungen in Abbildung 32:

W, X, Y, Z Zellgruppen.

Die sich entwickelnden Neuroblasten-Zelllinien benötigen beim Auswachsen zur Orientierung ein axonales Gerüst. Dieses wird unter anderem von Pionierneuronen, wie den LCs, PCPs und SCNs, aufgebaut. Auf die Entwicklung dieser Zellen wird im folgenden Abschnitt dieser Arbeit eingegangen.

5.2 Bildung und Herkunft bestimmter Zellen im Mittelgehirn und der primären Kommissur

Einige der Pioniernuronen im Mittelgehirn der Wüstenheuschrecke, die das axonale Gerüst bilden, sind bereits identifiziert (siehe 5.2):

- Laterale Zellen (Ludwig et al., 1999, 2001; Graf et al., 2000; Boyan et al., 1995a, 2003)
- Primäre Pioniere der protocerebralen Kommissur (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002; Boyan et al., 2003)
- Sekundäre Pioniere der protocerebralen Kommissur (Ludwig et al., 1999).

5.2.1 Identifizierte Zellen der dorsalen medianen Domäne während der frühen Embryogenese

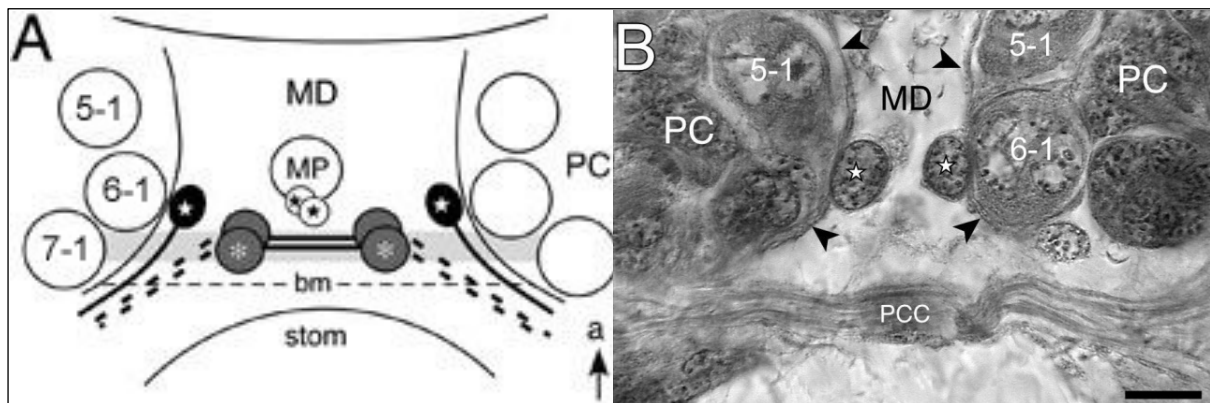


Abbildung 33: Lage der PCP- und LC-Zellen.

Maßstab: 15µm.

Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). Arthropod Struct Dev 33, 125-137. Verändert.

Ausführungen zu Abbildung 33:

Lage der primären Pioniere der protocerebralen Kommissur und Lateralen Zellen bei 33% der Embryonalentwicklung.

Bild A: schematische Darstellung der medianen Domäne und des angrenzenden Protocerebrums.

↑ zeigt nach anterior. ○ Neuroblasten. ■ Laterale Zellen. ★ Nachkommen der Mittellinienvorläuferzelle.

* primäre Pioniere der protocerebralen Kommissur. - - - Axone.

Bild B: Wigglesworth-Färbung derselben Region.

★ Somata der Lateralen Zellen. ► Grenzen der medianen Domäne.

Abkürzungen in Abbildung 33:

MP Mediane Vorläuferzelle. MD mediane Domäne. PC Protocerebrum. bm Basalmembran. stom Stomodäum.

PCC protocerebrale Kommissur. a anterior. 5-1, 6-1, 7-1 Neuroblasten.

Die mediane Domäne befindet sich exakt in der Mittellinie des Gehirns zwischen den beiden Gehirnhemisphären anterior zum embryonalen Darmrohr (Abbildung 33). Wie oben bereits

erwähnt, besteht die MD bis ca. 25% der Embryogenese aus undifferenzierten, epithelialen Zellen, die durch Gliazellen vom Neuroektoderm der Gehirnhemisphären getrennt sind. Diese Gliazellen exprimieren REGA-1 (*Schistocerca gregaria*: Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999). Es wurde eine Beteiligung des EGFR-Signalwegs an der Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen in der Gehirnmittellinie von *Drosophila* bewiesen (Dumstreit et al., 1998). Da in *Schistocerca gregaria* der mesektodermale Ursprung der MD noch nicht belegt ist, soll dieses in dieser Arbeit untersucht werden.

Die mediane Domäne besteht aus zwei Untereinheiten, die sich in ihrer Zellteilungsrichtung unterscheiden: die ventrale und die dorsale mediane Domäne. Die Zellen differenzieren zu verschiedenen Strukturen: Ventrale Zellen entwickeln sich in der Heuschrecke zu peripheren sensorischen Strukturen wie den medianen Ocellus (Mobbs, 1976; Goodman, 1981), dorsale Zellen differenzieren in verschiedene Interneuronentypen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind in *Schistocerca gregaria* drei unterschiedliche Typen identifiziert (Ludwig et al., 2001; Boyan et al., 2003):

- Die Mittellinienvorläuferzelle „median precursor“ lebt bis ca. 47% der Embryonalentwicklung und deren sechs Nachkommen differenzieren zu Interneuronen, die Axone in das ventrale Bauchmark projizieren und dieses innervieren (Ludwig et al., 1999, 2002).
- Bilateral gepaarte Pioniere der protocerebralen Kommissur projizieren Axone über die gesamte Länge des ventralen Bauchmarks und entwickeln sich zu neurosekretorischen Zellen (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002; Boyan et al., 2003). Die PCPs exprimieren als einzige Zellen des Gehirns das Term-1-Antigen (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999, 2001).
- Die ungepaarten Lateralen Zellen projizieren nicht in die kontralaterale Gehirnhemisphäre, sondern lateral entlang der Protocerebrumgrenze posterior in das Deutocerebrum (Ludwig et al., 1999, 2001; Graf et al., 2000; Boyan et al., 2003). Die LCs sind histologisch identifizierbar und befinden sich in der medianen Domäne auf der Gehirnebene des Neuroblasten 6-1.

5.2.2 Immunzytochemischer Charakter der LCs in der medianen Domäne

Boyan et al. (1995a) identifizierten die Lateralen Zellen erstmals durch eine intrazelluläre Injektion von Farbstoffen bei einer Embryonalentwicklung von 27%. Doppelimmunfärbungen zeigen, dass die LCs sowohl eine Expression von HRP, als auch von Mes-3 aufweisen

(Abbildung 34A), wobei HRP die neuronale Identität der Zellen und Mes-3 den mesektodermalen Ursprung beweisen. Die Axone und Zellkörper lassen bei 31% der Embryonalentwicklung eine Koexpression der beiden Antigene erkennen, wobei die Mes-3-Expression stärker ist (Abbildung 34A). Die Position der Lateralen Zellen ist stereotyp in der dorsalen medianen Domäne und befindet sich immer anterior zu den primären Pionieren der protocerebralen Kommissur. Die PCPs haben zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung bereits die ersten Faszikel der protocerebralen Kommissur gebildet. Die PCP-Zellen exprimieren ebenso wie die Lateralen Zellen HRP und Mes-3. Die Markierung mit HRP weist den neuronalen Charakter, die Markierung mit Mes-3 den mesektodermalen Ursprung der primären Pioniere der protocerebralen Kommissur nach.

Somit ergibt sich, dass sowohl die Lateralen Zellen als auch die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur Neuronen mesektodermalen Ursprungs sind.

Die LCs exprimieren außerdem das GPI-gekoppelte Lipocalin Lazarillo, das auch auf Zelloberflächen der medianen Domäne zu finden ist (Graf et al., 2000). Dieses wird durch eine Doppelfärbung mit Lazarillo und HRP bestätigt (Abbildung 34B). Die Experimente zeigen Zellen, deren Innervierungen von der medianen Domäne in die protocerebrale Kommissur ziehen, aber nicht die Mittellinie des Gehirns überschreiten.

Bei 36% der Embryonalentwicklung wachsen die Axone der LCs beidseitig in posteriorer Richtung. Die Filopodien faszikulieren mit Wachstumskegel von Zellen aus dem Deutocerebrum (Abbildung 34C). Damit gehören die Lateralen Zellen zum axonalen Grundgerüst des embryonalen Gehirns (siehe auch Graf et al., 2000).

Bei 38% der Embryonalentwicklung zeigt eine 3D-Rekonstruktion von aufeinander folgenden Gehirnschnitten, dass sich das Volumen der protocerebralen Kommissur im Vergleich zu früheren Entwicklungsstadien deutlich vergrößert hat (Abbildung 34D, E). Die PCC und die LCs liegen in derselben Gehirnebene. Die Lateralen Zellen projizieren Axone in die protocerebrale Kommissur und faszikulieren dorsal mit dieser. HRP und Lazarillo werden in den LCs koexprimiert (Abbildung 34F). Auch innerhalb eines Faszikels der PCC zeigt sich eine Koexpression dieser Antigene. Betrachtet man nur die Lazarillo-Expression, ist die Faszikulierung von Axonen in der protocerebralen Kommissur mit Axonen der Lateralen Zellen (Abbildung 34G) zu erkennen. Sie stammen vermutlich (Boyan et al., 1995a) von lateralen Neuropilen des Protocerebrums und den optischen Loben ab (Abbildung 13).

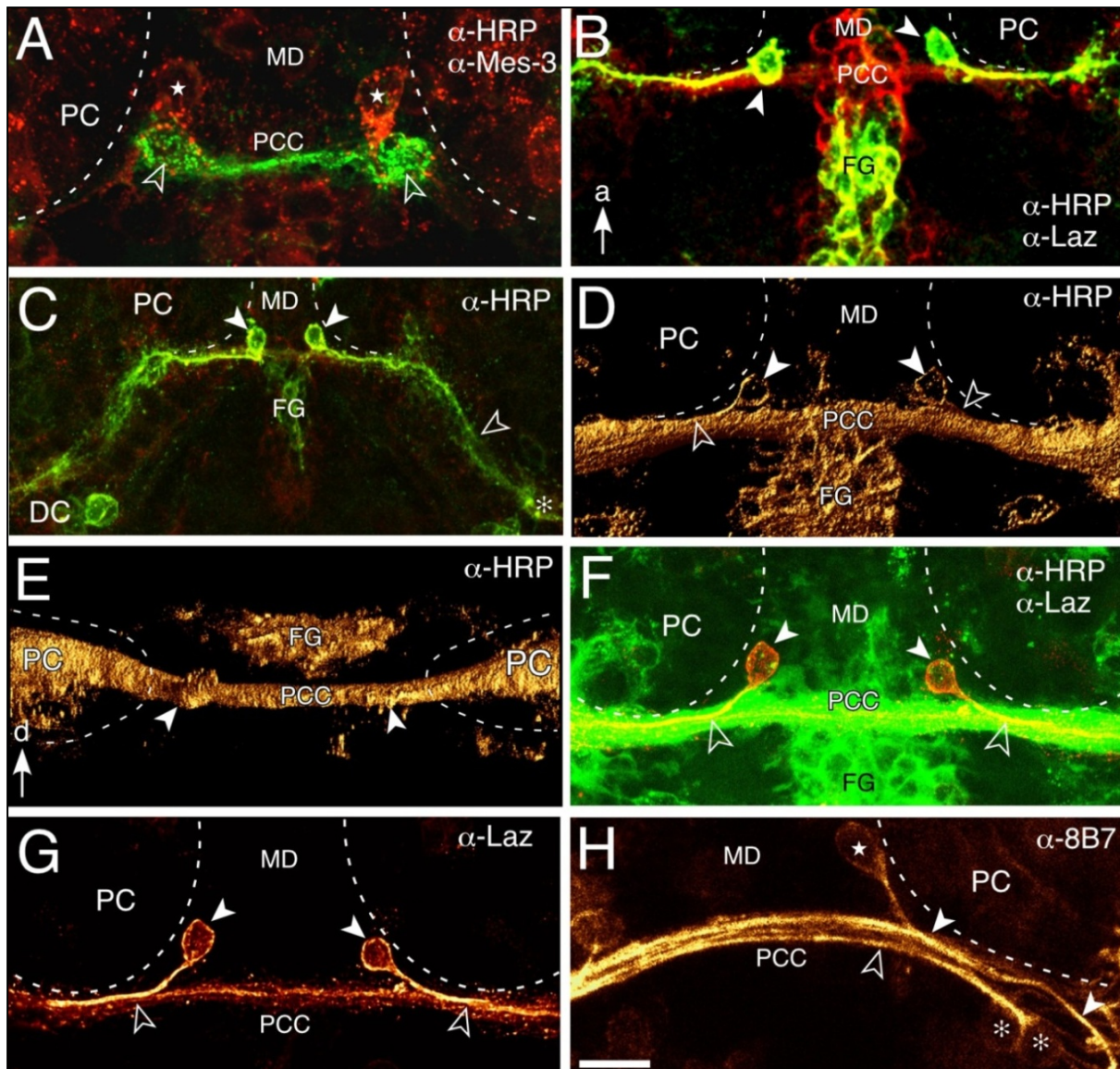


Abbildung 34: Immunzytochemische Färbungen gegen HRP und Doppelfärbungen mit Laz und Mes-3.
Maßstab: A 15µm. B 30µm. C 35µm. D 30µm. E 30µm. F 30µm. G 30µm. H 15µm.
Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). *Arthropod Struct Dev* 33, 125-137.

Ausführungen zu Abbildung 34:

Immunzytochemische Färbungen der Lateralen Zellen der medianen Domäne. Blickrichtung in den Bildern A-D und F-H nach anterior, in E nach dorsal.

Bild A: Konfokalbild der Doppelfärbung mit Meerrettichperoxidase (grün) und Mes-3 (rot) der medianen Domäne bei 31% der Embryonalentwicklung.

➤ Zellkörper der bilateralen primären Pioniere der protocerebralen Kommissur.

★ Somata der lateralen Zellen. - - - Grenze Protocerebrum.

Bild B: Konfokalbild der Doppelfärbung mit Meerrettichperoxidase (rot) und Lazarillo (grün) derselben Region bei 33% der Embryogenese. Gelbfärbung kennzeichnet Koexpression von Meerrettichperoxidase und Lazarillo.

➤ Somata der Lateralen Zellen. ↑ zeigt nach anterior.

Bild C: Konfokalbild mit Einzelfärbung gegen Meerrettichperoxidase (grün) bei 36% der Embryogenese.

➤ Filopodium einer Lateralen Zelle, das mit einem Axon einer Zelle aus dem Deutocerebrum faszikuliert (*).

➤ Laterale Zellen. - - - Grenze Protocerebrum.

Bild D: 3D-Rekonstruktionen einer Konfokalbilderserie von einer Einzelfärbung mit einem Meerrettichperoxidase-Antikörper bei 38% der Embryonalentwicklung. Es handelt sich dabei um ein Falschfarbenbild.

▶ Laterale Zellen. ▶ Axone der Lateralen Zellen. - - - Grenze Protocerebrum.

Bild E: 3D-Rekonstruktion wie Bild D, jedoch um 90° um die x-Achse gedreht (Blickrichtung dorsal).

▶ Somata der Lateralen Zellen. - - - Grenze Protocerebrum. ↑ zeigt nach dorsal.

Bild F: Konfokalbild einer Doppelfärbung mit Meerrettichperoxidase (grün) und Lazarillo (orange/rot) der medianen Domäne bei 38% der Embryonalentwicklung.

Die Gelbfärbung kennzeichnet die Koexpression der beiden Antigene.

▶ Laterale Zellen. ▶ Axone der Lateralen Zellen, die in die protocerebrale Kommissur projizieren.

- - - Grenze Protocerebrum.

Bild G: Selbes Präparat wie in F, jedoch mit einem Rotfilter aufgenommen, um die Lazarilloexpression sichtbar zu machen. Auch hier sind Falschfarben abgebildet.

▶ Laterale Zellen, die in diesem Stadium der Embryogenese die einzigen Zellen mit Lazarilloexpression sind und an einer bestimmten Stelle in die protocerebrale Kommissur ▶ eintreten.

- - - Grenze Protocerebrum.

Bild H: Konfokalbild einer Einzelfärbung mit 8B7 bei 39% der Embryonalentwicklung in Falschfarben.

★ Laterale Zelle, die ein Axon Richtung protocerebrale Kommissur schickt und dort in ein spezifisches, ko-exprimierendes Faszikel ▶, bei dem es sich nicht wie erwartet um das Faszikel der ipsilateralen Neuronen ▶ handelt, eintritt.

Somata der sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur * - - - Grenze Protocerebrum.

Abkürzungen in Abbildung 34:

HRP Meerrettichperoxidase .

Mes-3 Methylesterase.

MD mediane Domäne.

PC Protocerebrum.

PCC protocerebrale Kommissur.

Laz Lazarillo.

FG Frontalganglion.

DC Deutocerebrum.

a anterior.

d dorsal.

8B7 Akt2-Isoform der Proteinkinase B.

Eine Immunfärbung gegen 8B7, ein axonspezifisches intrazelluläres Antigen, welches in *Drosophila* in der frühen Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen und später ausschließlich von Axonen exprimiert wird (Seeger et al., 1993), zeigt bei 39% der Embryonalentwicklung von *Schistocerca gregaria*, dass es sich dabei nicht um Axone der sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur handelt. Die SCNs bilden mit den PCPs und den LCs ein Faszikel in der protocerebralen Kommissur (Abbildung 34H).

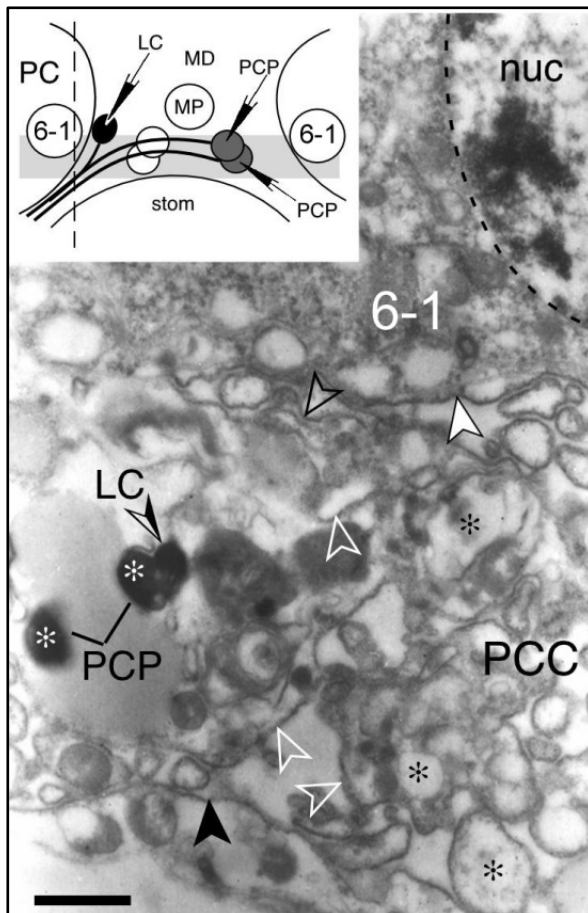


Abbildung 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines parasagittalen Gehirnschnittes.
Maßstab: 2µm.
Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). *Arthropod Struct Dev* 33, 125-137. verändert.

Erläuterung zu Abbildung 35:

Intrazelluläre Farbinjektion von Lucifer Yellow in die ipsilateralen Lateralen Zellen und die kontralateralen Pioniere der protocerebralen Kommissur Zellen der medianen Domäne.

➤ Grenze Protocerebrum.

✱ Soma Pioniere der protocerebralen Kommissur.

➤ Basalmembran.

--- Zellkernmembran des Neuroblasten 2.

➤ Axon der lateralen Zellen.

▢ die protocerebrale Kommissur umhüllende Membran.

➤ Zellmembran Neuroblast 6-1.

* nicht identifizierte Axone der protocerebrale Kommissur.

Integrierte Abbildung:

--- Schnittebene.

✱ Injektion, zukünftige primäre Pioniere der protocerebralen Kommissur.

Abkürzungen in Abbildung 35:

PC Protocerebrum. LC Laterale Zelle. MD Mediane Domäne. PCP Pioniere der protocerebralen Kommissur.
MP mediane Vorläuferzelle. nuc Nukleus des NB 6-1. stom Stomodaeum. PCC Protocerebrale Kommissur.

Die Auswertung der Elektronenmikroskopaufnahmen zeigt, dass die LCs ein Axon Richtung PCP senden und das Axon der Lateralen Zelle mit einem der Pioniere der protocerebralen Kommissur faszikuliert (Abbildung 35).

5.2.3 Faszikulierung von identifizierten Axonen des primären Faszikels der protocerebralen Kommissur

Die Faszikulierung von Axonen kann mit Immunelektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden. Jedoch ergibt diese Methode nicht immer eindeutige Ergebnisse, da es zu unspezifischen Färbungen kommen kann. Um spezifische Resultate zu erzielen, wurde Lucifer Yellow im frühen Embryonalstadium (30-35%) direkt in die LCs auf der ipsilateralen Seite und in die paarigen primären Pioniere der protocerebralen Kommissur auf der kontralateralen Seite, die als mögliche Kandidaten für die Faszikulierung gelten, injiziert. Die

Fluoreszenzfärbung durch LuY wurde durch intensive UV-Bestrahlung ausgebleicht. Die gleichzeitige Applikation von DAB bewirkt einen Einbau des DAB in den Gewebestellen, die vorher mit LuY gefärbt waren (Fotokonversion: Sandell und Masland, 1988). Das Gewebe wird durch das DAB elektronendicht. Die Färbung ist stabiler als die Fluoreszenzfärbung und kann unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden. Von diesen, in dieser Weise behandelten Präparaten, wurden Semidünn-Schnitte zur 3D-Rekonstruktion der Axone verwendet.

5.2.4 Entwicklung der Lateralen Zellen: Iontophoretische Markierung mit DiI und Lucifer Yellow

Um den Ursprung der Lateralen Zellen, der primären Pioniere der protocerebralen Kommissur und der medianen Vorläuferzelle zu untersuchen, wurde die Methode der iontophoretischen Farbstoffinjektion verwendet. Dazu kamen die Farbstoffe DiI – bei direktem Zellkontakt Übertragungen über die Membran auf Vorläuferzellen und Nachkommen (Zelllinienfarbstoff) – und LuY – wird durch „gap junctions“ an benachbarte Zellen (MD *Scg*: Ludwig et al., 1999; ventrales Bauchmark *Scg*: Goodman und Spitzer, 1979) weitergegeben – zum Einsatz.

Bei 31% der Embryonalentwicklung wurde eine mit DiI (Bossing und Technau, 1994) gefüllte Elektrode auf das Soma einer LC platziert und Strom appliziert. Da der Farbstoff lipophil ist, gelangt er durch die Zellmembran ins Zellinnere. Durch die Applikation von DiI wurde die gesamte Zellmorphologie sichtbar (Abbildung 36A). Aus dem Axon und dem Wachstumskegel, die sich lateral entlang des Protocerebrums entwickeln, entspringen eine Vielzahl von Filopodien (Abbildung 36A). Jedoch wurde keine Kopplung und Übertragung von Farbstoffen zu anderen Zellen wie z.B. zu den Vorläuferzellen der medianen Domäne und des Protocerebrums beobachtet. Mit dem Einsatz des Farbstoffs DiI gelang es, die Entwicklung der Lateralen Zellen aufzuzeigen und zu dokumentieren: Die Lateralen Zellen delaminieren direkt aus dem Mesektoderm und stammen nicht von Neuroblasten ab.

Bei 31-35% der Embryonalentwicklung breiten sich die Axone lateral innerhalb der protocerebralen Kommissur aus (Abbildung 36). In diesem Zeitraum der Embryogenese durchgeführten iontophoretischen Markierungen mit DiI (Abbildung 43A) und LuY (Abbildung 43B) zeigen ähnliche Ergebnisse. Jedoch wird mit LuY die Vielzahl an Filopodien nicht dargestellt, da LuY vermutlich nicht in kleinste Filopodienverzweigungen gelangt.

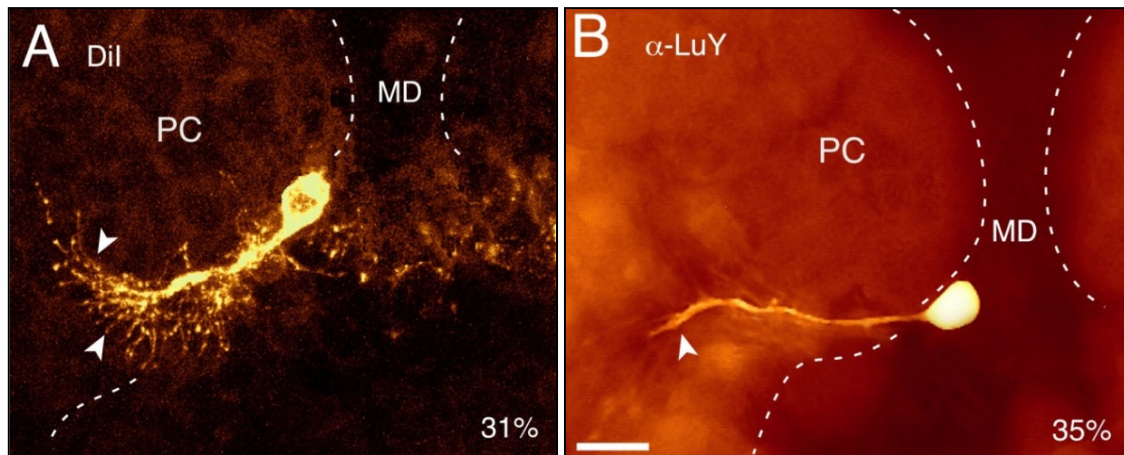


Abbildung 36: Iontophoretische Markierung mit DiI und LuY in Lateralen Zellen

Maßstab: 15µm.

Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). *Arthropod Struct Dev* 33, 125-137.

Anmerkungen zu Abbildung 36:

Bild A: Videobild einer Diiodotetrakisäure-Injektion in das Soma einer Lateralen Zelle bei 31% der Embryonalentwicklung.

► Filopodien aus dem Axon und dem Wachstumskegel. Es ist keine Farbstoffkopplung zu anderen Zellen der medianen Domäne oder des Protocerebrums zu beobachten. --- Grenze Protocerebrum.

Bild B: Videobild einer Lucifer Yellow-Injektion in das Soma einer Lateralen Zelle bei 35% der Embryonalentwicklung.

Auch hier ist keine Farbstoffkopplung zu Zellen der medianen Domäne oder zum Protocerebrum zu beobachten.

► reduzierte Anzahl an Filopodien. --- Grenze Protocerebrum.

In beiden Abbildungen ist anterior oben.

Abkürzungen in Abbildung 36:

DiI Diiodotetrakisäure.

MD Mediane Domäne.

PC Protocerebrum.

LuY Lucifer Yellow.

Auch bei der Färbung mit Lucifer Yellow wird weder im Protocerebrum noch in der medianen Domäne eine Farbstoffübertragung auf benachbarte Zellen beobachtet. Die Beobachtung der fehlenden Farbstoffkopplung zwischen den Zellen führt zu der Schlussfolgerung: LCs entstehen, wie Pioniere der Antenne (Ho und Goodman, 1982) oder der Beine (Keshishian und Bentley, 1983) direkt durch die Invagination aus dem Epithel und nicht aus konventionellen Vorläuferzellen wie der Mittellinienvorläuferzelle oder NBs.

5.2.5 Entwicklung der Lateralen Zellen: Immunzytochemischer Beweis für den mesektodermalen Ursprung

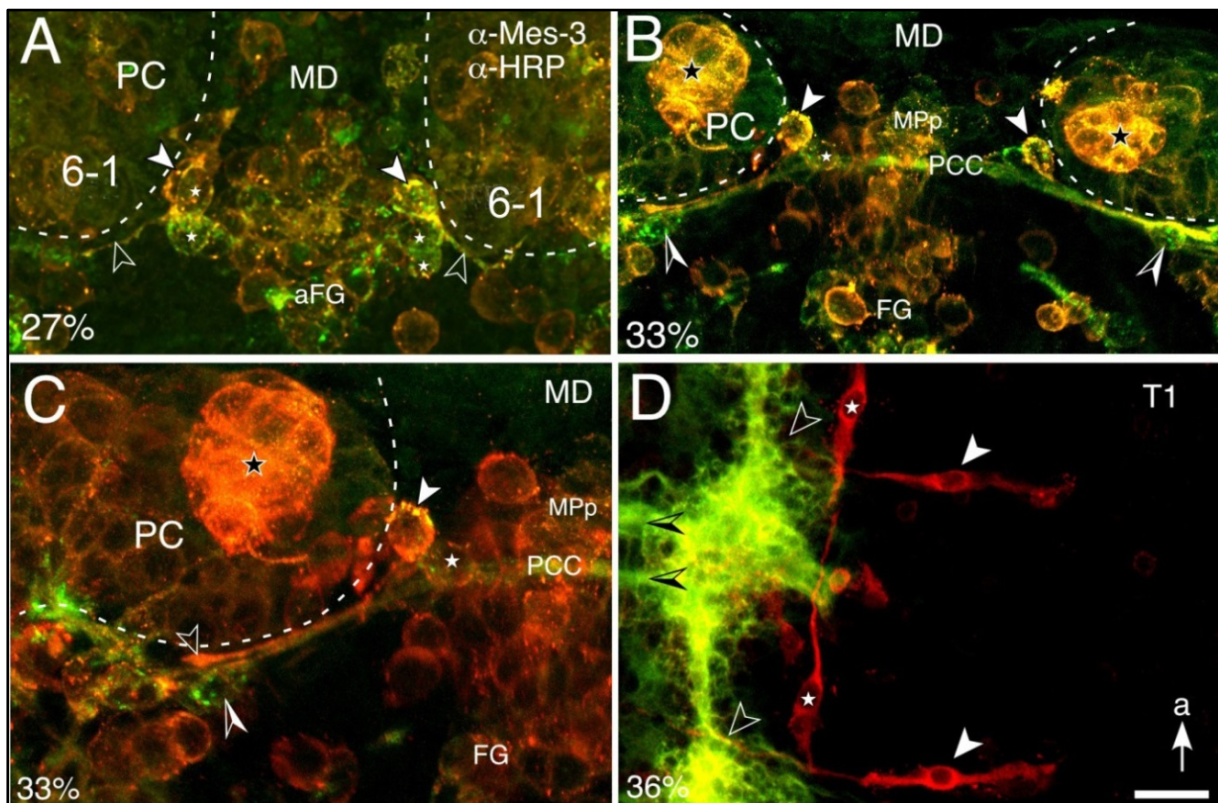


Abbildung 37: Mesektodermaler Ursprung von Lateralen Zellen und Pionieren der protocerebralen Kommissur in der medianen Domäne des Heuschreckengehirns.

Maßstab: Bild A 25µm. Bild B 30µm. Bild C und D 20µm.

Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). Arthropod Struct Dev 33, 125-137. verändert.

Erklärungen zu Abbildung 37:

- Bild A:** --- Grenze Protocerebrum. 6-1 Neuroblast. ► Laterale Zelle.
 ★ Primärer Pionier der protocerebralen Kommissur. ► Axon der Lateralen Zelle.
- Bild B:** --- Grenze Protocerebrum. ► Laterale Zelle. ★ Protocerebrale Zellen.
 ► Sekundärer Pionier der protocerebralen Kommissur. ★ Primärer Pionier der protocerebralen Kommissur.
- Bild C:** --- Grenze Protocerebrum. ► Laterale Zelle. ★ Protocerebrale Zellen.
 ► Sekundärer Pionier der protocerebralen Kommissur. ★ Primärer Pionier der protocerebralen Kommissur.
 ► Wachstumskegel der Lateralen Zelle.
- Bild D:** ★ longitudinale Muskelpioniere. ► Kommissur des Bauchmarks.
 ► Somata der intersegmentalen Nerven. ► Axon der intersegmentalen Nerven. ↑ zeigt nach anterior.

Abkürzungen in Abbildung 37:

Mes-3 Methylsterase. HRP Meerrettichperoxidase. PC Protocerebrum. MD Mediane Domäne.

aFG Anlage des Frontalganglions. PCC protocerebrale Kommissur.

MPp Nachkomme der Mittellinienvorläuferzelle. FG Frontalganglion. T1 prothorakales Neuromer. a anterior.

Wie die Ergebnisse der oben genannten Experimente vermuten lassen, entstehen die Lateralen Zellen aus der medianen Domäne des Heuschreckengehirns. Die mediane Domäne selbst ist sowohl in der *Drosophila* (Dumstreit et al., 1998) als auch in der Heuschrecke (Ludwig et al.,

1999) mesektodermalen Ursprungs. Die mesektodermale Spezifität von Mes-3 wurde im Bauchmark (Kotrla und Goodman, 1984; Kuwada und Goodman, 1985), in der Mittellinie (Goodman und Doe, 1993) und in Muskelvorläuferzellen (Kuwada und Goodman, 1985) von *Schistocerca gregaria* bestätigt. Die Expression von Mes-3 zeigt immer den mesektodermalen Ursprung von Zellen an. Um den mesektodermalen Ursprung der LCs zu beweisen, wurde die Expression von Mes-3 auf diesen Zellen untersucht. Mit dem Ergebnis: Mes-3-Antigene befinden sich auf der gesamten Zelloberfläche der Lateralen Zellen einschließlich ihrer Wachstumskegel (Abbildung 37).

Doppelfärbungen gegen HRP und Mes-3 bei 27% der Embryogenese zeigen, dass die Lateralen Zellen bereits ausdifferenziert sind und beide Antigene auf deren Somata und Axone exprimieren (Abbildung 37A). Dieses Ergebnis erhärtet die Aussage: LCs stammen aus dem Mesektoderm und sind neuronalen Ursprungs. Ebenso exprimieren die Pioniere der protocerebralen Kommissur und die Anlage des Frontalganglions bei 31% der Embryonalentwicklung sowohl HRP als auch Mes-3, was auch bei diesen Zellen auf einen Ursprung im Mesektoderm schließen lässt.

Bei 33% der Embryogenese koexprimieren die LCs und PCPs weiterhin Mes-3 und HRP (Abbildung 37B, C). Dabei zeigen jeweils die gesamte Zelle und der Wachstumskegel eine Mes-3-Expression. Außerdem ist eine Färbung der Abkömmlinge der medianen Vorläuferzelle erkennbar. Die sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur weisen nur die Expression des neuronenspezifischen Markers HRP, nicht jedoch die von Mes-3 auf. Das heißt: Die SCNs sind ektodermalen Ursprungs, im Gegensatz zu LCs und PCPs, die aus dem Mesektoderm delaminieren.

Zusätzlich wurde eine starke Expression von Mes-3 in je einer klar umrissenen Zellgruppe in beiden Gehirnhemisphären festgestellt. Es könnte sich dabei um neurosekretorische Zellen des retrocerebralen Komplexes (Corpora cardiaca, Corpora allata) mit mesektodermalen Ursprung handeln. Außerhalb des Gehirns konnte Mes-3-Expression im Bauchmark gezeigt werden (Abbildung 37D). Diese Daten decken sich mit Daten von Kotrla und Goodman (1984) und Kuwada und Goodman (1985). Ergebnisse außerhalb der medianen Domäne des Gehirns waren nicht Bestandteil der Untersuchungen. Es gibt jedoch Parallelen zur Herkunft und Entstehung mesektodermaler Zellen bei Mammalia, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird.

5.2.6 Entwicklung der Lateralen Zellen: Zellwanderungen in der dorsalen medianen Domäne des frühen embryonalen Gehirns der Heuschrecke

Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen den mesektodermalen Ursprung der identifizierten Zellen, jedoch nicht, auf welche Weise diese Zellen ihre charakteristischen Lagen im Gehirn erreichen.

Die Technik der BrdU-Einlagerung, die mitotisch aktive Zellen nachweist, wurde in der Peripherie der medianen Domäne bereits 1999 von Ludwig et al. verwendet. Bei der histologischen Untersuchung der dorsalen Untereinheit mit einer Wigglesworth-Färbung (Abbildung 38) wurden epitheliale Zellen gefunden, die filopodienähnliche Fortsätze Richtung Basalmembran senden (Abbildung 38A). Andere Zellen delaminieren aus dem Ektoderm und wandern entlang dieser filopodienähnlichen Fortsätze (Abbildung 38B). Unter diesen Zellen befindet sich auch die große mitotisch aktive mediane Vorläuferzelle (Abbildung 38C). Eine Zusammenfassung der gefundenen Entwicklungen und Wanderungen ist schematisch in Abbildung 38D dargestellt.

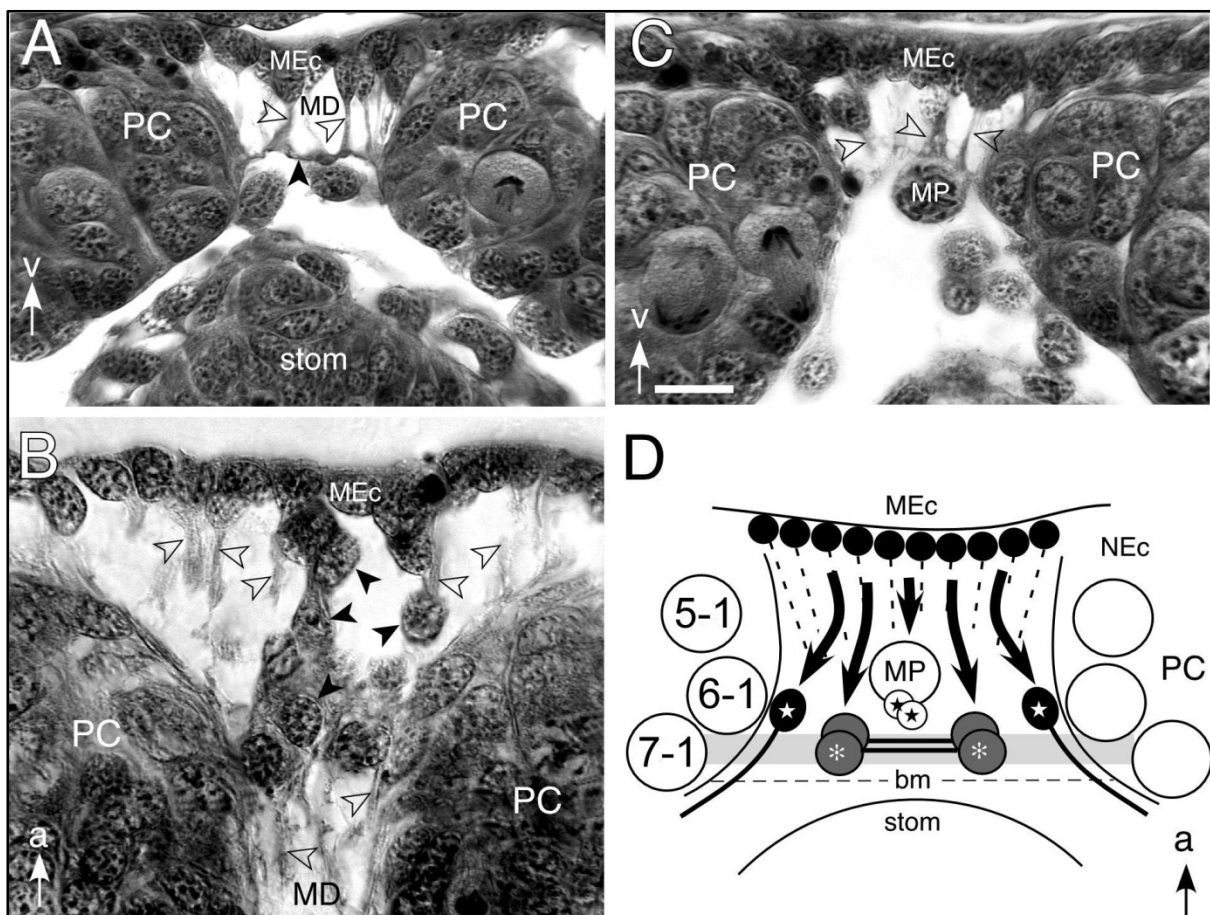


Abbildung 38: Zellwanderungen in der dorsalen medianen Domäne bei 34% der Embryogenese. Wigglesworth-Färbung. Maßstab: Bild A und C 20µm. Bild B 15µm. Quelle: Boyan, Posser, Ludwig, Güntner, Williams (2004). Arthropod Struct Dev 33, 125-137. verändert.

Anmerkungen zu Abbildung 38:

Mikroskopische Aufnahme von Gehirnschnitten. Verschiedene Schnittebenen.

Bild A: epitheliale Zelle aus dem Mesektoderm der medianen Domäne.

➤ Prozesse dieser Zellen, die Richtung Basalmembran ➤ ziehen. Der ↑ zeigt nach ventral.

Bild B: Selbe Schnittebene wie in Bild A, andere Vergrößerung und Blickrichtung.

➤ Prozesse von mesektodermalen Zellen. ➤ bereits delaminierte Zellen auf ihrem Weg in die posteriore Region der medianen Domäne. ↑ zeigt nach anterior.

Bild C: andere Schnittebene als in Bild A. Große mediane Vorläuferzelle umgeben von mesektodermalen Prozessen der medianen Domäne ➤. ↑ zeigt nach ventral.

Bild D: Schematische Zusammenfassung mit den vermutlichen Ursprüngen der Lateralen Zellen ★, der Pioniere der protocerebralen Kommissur * und der Nachkommen der medianen Vorläuferzelle ★.

Die identifizierten Zellen delaminieren vermutlich aus dem am weitesten anterior gelegenen mesektodermalen Epithelium und wandern posterior entlang zellulärer Prozesse --- zu ihren unterschiedlichen Zielen in der medianen Domäne ↙.

Die ungefähre Lage der Basalmembran ist angedeutet. Benachbarte Neuroblasten ○ des Protocerebrums entstehen aus dem Neuroektoderm. ↑ zeigt nach anterior.

Abkürzungen in Abbildung 38:

MEc epitheliale Zellen aus dem Mesektoderm. MD medianen Domäne. PC Protocerebrum. v ventral. a anterior. stom Stomodeum. MP medianen Vorläuferzellen. NEc Neuroektoderm. NB Neuroblast. bm Basalmembran.

Zusammenfassend lassen sich aus den Untersuchungsergebnissen folgende Schlüsse ziehen:

- Die Lateralen Zellen und die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur delaminieren, wie die MP aus dem mesektodermalen Epithelium.
- Sie wandern zu ihren jeweils charakteristischen Bestimmungsorten in der dorsalen medianen Domäne.
- Diese Wanderungen finden zwischen 27% (erstes Erscheinen im Epithelium, siehe 5.2.2) und 34% (Ankunft am Zielort) der Embryogenese statt.
- Die sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur haben ihren Ursprungsort im Ektoderm, da sie Mes-3-negativ sind.

Das, durch die identifizierten Zellen der medianen Domäne (LCs, PCPs) und das anteriore und posteriore Kommissurensystem gebildete, axonale Gerüst, dient komplexen Neuropilen wie dem Zentralkomplex als Orientierung bei deren embryonaler Entwicklung. Der charakteristische Aufbau des Zentralkomplexes zeigt sich bereits bei 80% der Embryogenese (Abbildung 4). Durch Antikörperfärbungen gegen Botenstoffe und Neuromodulatoren kann die Morphologie nachgewiesen werden (Homberg, 1991; Vitzthum et al., 1996). Einige dieser Botenstoffe und Neuromodulatoren werden bereits funktional im Embryo benötigt, andere

beim Schlüpfvorgang (Stay und Tobe, 2007) und wieder andere erst im adulten Tier (Predel und Wegener, 2006).

Im folgenden Teil der Arbeit werden Expressionsmuster verschiedener Botenstoffe und Neuromodulatoren in der Embryonalentwicklung, in der larvalen und in der adulten *Schistocerca gregaria* beschrieben.

5.3 Expression von Neuromodulatoren in der Entwicklung des Zentralkomplexes

Die embryonale Entwicklung von Expressionsmustern einiger bekannter Neuromodulatoren wird im folgenden Abschnitt der Arbeit beschrieben. Da nicht alle Neuromodulatoren wegen fehlender spezifischer Antikörper auf die angewandten direkten und indirekten Färbemethoden ansprechen, kam die (zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie) neu entwickelte Technik des MALDI-IMS zum Einsatz (Crecelius et al., 2005).

5.3.1 Identifikation von Neuromodulatoren im Gehirn durch Massenspektrometrie

Vor wenigen Jahren war es erstmals möglich, das bildgebende Verfahren MALDI-TOF (Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie mit Flugzeit-Analyse) durch seine Weiterentwicklung MALDI-IMS auf Insektengehirnschnitten anzuwenden. Um die gesuchten Neuromodulatoren nachweisen zu können, wurden *Scg*-Gehirnschnitte mit einem Laser beschossen und die erhaltenen Daten in ein Spektrum der Peptidgrößen übertragen. In dem Spektrum wurden insgesamt 62 Peptid-Peaks festgestellt (Abbildung 39). Die Peptidgrößen betrugen zwischen 800 und 5000 Dalton. 35 dieser 62 Peptide wurden im Zentralkomplex gefunden.

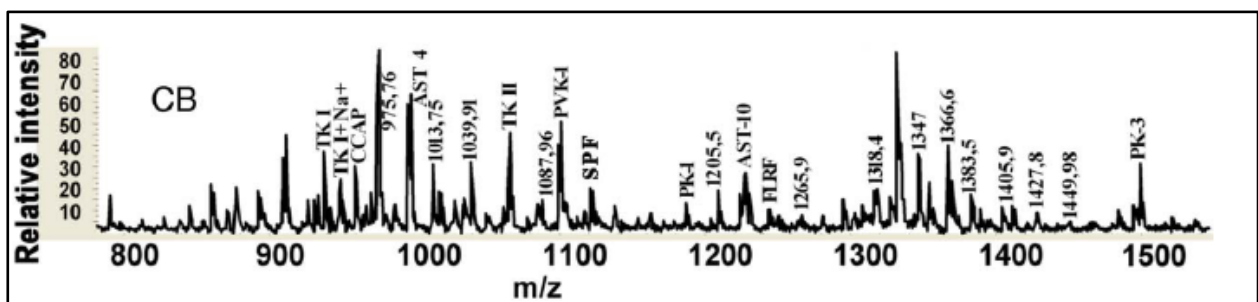


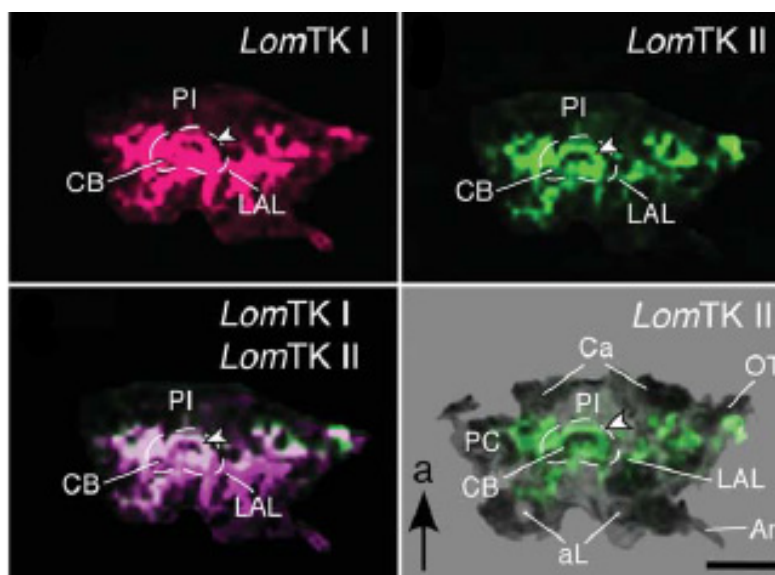
Abbildung 39: Spektrum der Neuropeptide des Zentralkörpers mit einem Gewicht von 800 bis 1500 Dalton aus Gehirnschnitten der Heuschrecke *Schistocerca gregaria*.

Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526.

Durch die im Experiment festgestellten atomaren Massen konnten elf insektenspezifische Neuropeptide identifiziert werden: *Lom*-Tachykinin I und II, *Scg*-Allatostatin 1, 4 und 10, *Scg*-FLRFamide, *Scg*-Pyrokinin 1 und 3, *Lom*-Periviscerokinin 1, *Scg*-Periviscerokinin 3 und *Scg*-Neuropeptid F (SPF). Dabei handelt es sich um Peptide der Familien Tachykinine, Allatostatine, FLRFamide, PK/PVK Peptide und Neuropeptid F (Tabelle 7).

Neuropeptid	Gemessene monoisotopische Masse in Da	Theoretische monoisotopische Masse in Da
Tachykinine		
<i>Lom</i> -Tachykinin I	938,73	939,46
<i>Lom</i> -Tachykinin II	1066,23	1066,56
Allatostatine		
<i>Scg</i> -Allatostatin 1	2182,53	2181,10
<i>Scg</i> -Allatostatin 4	996,83	996,50
<i>Scg</i> -Allatostatin 10	1227,46	1229,60
FLRFamide		
<i>Scg</i> -FLRFamid	1245,62	1244,42
Pyrokinine/Periviscerokinine		
<i>Scg</i> -Pyrokinin-1	1186,95	1185,35
<i>Scg</i> -Pyrokinin-3	1498,63	1499,90
<i>Lom</i> - Periviscerokinin-1	1101,20	1103,60
<i>Scg</i> -Periviscerokinin-3	1802,17	1800,10
Neuropeptid F		
<i>Scg</i> -Neuropeptid F	1123	1123,70

Tabelle 7: Neuropeptide des Zentralkomplexes aus den Familien: Tachykinine, Allatostatine, FLRFamide, PK/PVK und Neuropeptid F.



Angaben zu Abbildung 40:

➤ Ebene Ib des Zentralkörpers.

--- Umgrenzung des Zentralkörpers.

Die weißlichen Bereiche zeigen eine Koexpression von *Locusta migratoria*-Tachykinin I und *Locusta migratoria*-Tachykinin II.

↑ zeigt nach anterior.

Abbildung 40: Expressionsmuster von *LomTK I* und *LomTK II* im adulten Heuschreckengehirn. Maßstab: 250µm. Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526.

Abkürzungen in Abbildung 40

LomTK *Locusta migratoria*-Tachykinin. PI Pars intercerebralis. CB Zentralkörper.

LAL lateraler akzessorischer Lobus. Ca Calyx des Pilzkörpers. OT optischer Trakt. PC Protocerebrum.

aL antennaler Lobus. An Antenne. a anterior.

Aus den Peakmustern von *LomTK I* und *LomTK II* von verschiedenen Stellen des Gehirns konnten farbige Peptidkarten erstellt werden (Abbildung 40). Die Peptidkarten der beiden

Tachykinine zeigen sehr ähnliche Expressionsmuster in der protocerebralen Brücke und dem Mittelgehirn. Die Überblendung der beiden Peptidkarten zeigt eine starke Kollokalisierung der beiden Peptide innerhalb des Zentralkörpers. Die größte Konzentration der beiden Tachykinine fand sich in der Ebene Ib des Zentralkörpers. Die Peptidkarten zeigen *LomTK*-Expression im Zentralkörper, in benachbarten Gebieten der protocerebralen Brücke, im optischen Trakt und in den Pilzkörperpedunkeln, dagegen keine Expression in den antennalen Loben und im Antennennerv.

5.3.2 Expressionsmuster differenter Moleküle im Zentralkomplex in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der *Schistocerca gregaria*

Die Veränderungen der Expressionsmuster der einzelnen Peptidfamilien, des biogenen Amins Serotonin und des gasförmigen Botenstoffes NO werden hinsichtlich der gefärbten Zentralkörperbereiche und deren Farbintensität für verschiedene Embryonal-, Larvalstadien und in der adulten Heuschrecke dargestellt.

5.3.2.1 *LomTK*-Immunreaktivität

LomTK zeigt in den meisten Teilen des adulten Zentralkörpers eine starke Immunreaktivität. Vitzthum und Homberg (1998) unterscheiden in der adulten Heuschrecke bei den *LomTK*-exprimierenden Neuronen (LT) des Zentralkomplexes sechs verschiedene Typen: vier kolumnare Neuronengruppen (LTC I bis IV) und zwei tangentialen Neuronengruppen (LTT I und II). Die LTC I Zellen befinden sich anterior der Pars intercerebralis, projizieren in die Trakte des Zentralkörpers und haben Verbindung zu Verzweigungen der protocerebralen Brücke, des ellipsoiden Körpers und des lateralen Dreiecks der lateralen akzessorischen Loben. Die LTC II Zellen befinden sich anterior zur protocerebralen Brücke und projizieren über die Kolumnen in die PB und in das laterale Dreieck der LALs. Die LTC III Zellgruppe besteht aus acht großen und 16 kleinen Neuronen, die sich anterior zur PB befinden, sich verzweigen und die Ebenen I und II des Zentralkörpers innervieren. LTC IV Neuronen projizieren über acht große Nervenfaserbündel in die posteriore Furche und verzweigen sich in den Ebenen I und IIa des Zentralkörpers. Im inferioren medianen Bereich der protocerebralen Brücke, befinden sich die tangentialen Neuronen LTT I. Sie projizieren in die LAL und verzweigen sich in den lateralen Trakten, projizieren dann weiter durch den Isthmus zum ellipsoiden Körper. Die LTT II Neuronen sind posteriore PI-Neuronen, die sich stark in die protocerebrale Brücke verzweigen und im medianen Protocerebrum der kontralateralen Gehirnhälfte enden.

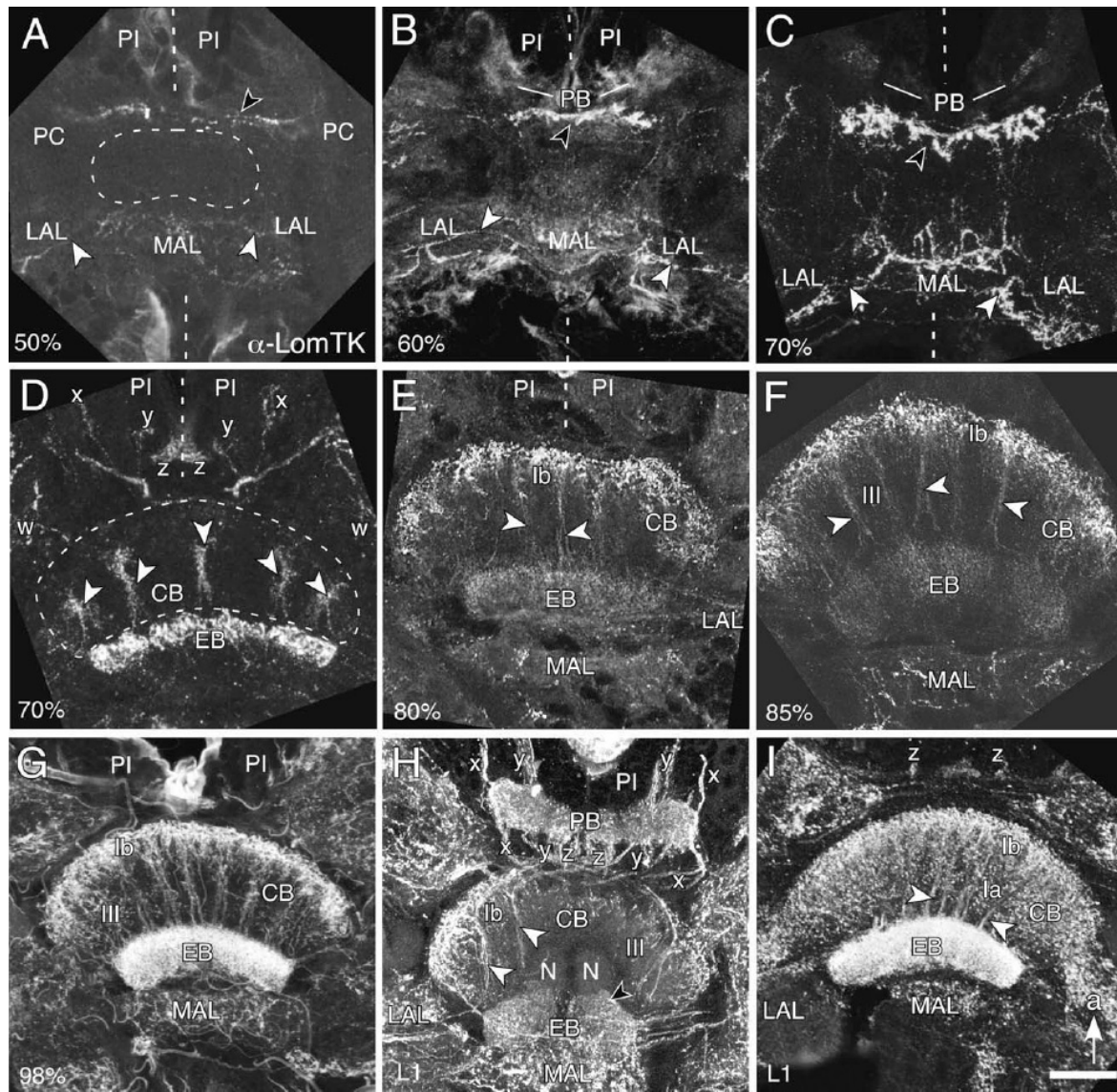


Abbildung 41: Konfokalbilder der *LomTK*-Immunreaktivität.
 Maßstab: Bild A 25µm. Bild B 30µm. Bild C und D 35µm. Bild E und F 40µm. Bild G bis I 50µm.
 Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526.

Erklärungen zu Abbildung 41:

Bild A: 50% der Embryonalentwicklung. ► lateraler akzessorischer Lobus.

► bilaterale Projektionen der protocerebralen Brücke. ■ Mittellinie --- Umgrenzung Zentralkörper.

Bild B: 60% der Embryonalentwicklung. ► lateraler akzessorischer Lobus. ► mediane Region. ■ Mittellinie.

Bild C und D: 70% der Embryonalentwicklung. ► lateraler akzessorischer Lobus.

--- Umgrenzung Zentralkörper. ► Region der Gehirnmittellinie. ■ Mittellinie.

Bild E: 80% der Embryonalentwicklung. ► Trakte des Zentralkörpers. ■ Mittellinie.

Bild F: 85% der Embryonalentwicklung. ► Trakte des Zentralkörpers.

Bild G: 98% der Embryonalentwicklung.

Bild H und I: Erstes Larvalstadium. ► Trakte des Zentralkörpers. ↑ zeigt nach anterior.

Abkürzungen Abbildung 41:

PI Pars intercerebralis. PC Protocerebrum. LAL lateraler akzessorischer Lobus. MAL medianer akzessorischer Lobus. PB protocerebrale Brücke. CB Zentralkörper. w, x, y, z Trakte w, x, y, z.

EB ellipsoider Körper. Ia, Ib, III Ebenen des Zentralkörpers. L1 erstes Larvalstadium. a anterior.

Während der Embryogenese wurde die *LomTK* Immunreaktivität das erste Mal bei 50% der Entwicklung in tangentialen Neuronen der sich entwickelnden LAL beobachtet. Diese Neuronen enden im Gebiet des ellipsoiden Körpers posterior zum zukünftigen Zentralkörper (Abbildung 41). Das Muster entspricht dem der tangentialen LTT I, beschrieben durch Vitzthum und Homberg (1998), in der adulten *Schistocerca gregaria*. Zusätzlich zeigen Fasern der anterioren Kommissur eine Immunreaktivität. Es konnte jedoch kein Bezug zur protocerebralen Brücke hergestellt werden. Im Bereich der zukünftigen Lokalisation des Zentralkörpers (Abbildung 41A) ist keine Färbung erkennbar.

Bei 60% der embryonalen Entwicklung werden die *LomTK*-immunreaktiven Verzweigungen noch deutlicher. Zusätzlich zeigen weitere tangentielle Projektionen *LomTK*-Aktivität. Im adulten Tier entsprechen diese Projektionen wegen ihrer Lage und Anordnung den LTT II Neuronen. Die markierten Strukturen der LALs entsprechen örtlich den adulten LT und dem Isthmus. Außerdem findet man eine leichte *LomTK*-Färbung in der protocerebralen Brücke und posterior von dieser, außerhalb des Zentralkomplexes (Abbildung 41B).

Kolumnare Neuronen und deren Projektionen können erstmals bei 70% der Embryogenese beobachtet werden. Starke Immunreaktivität findet man in der PB, den *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakten, den kolumnaren Fasern des Zentralkörpers und im ellipsoiden Körper. Verzweigungen bestehen in der Ebene Ib des Zentralkörpers (Abbildung 41C, D). Die Projektionen entsprechen den LTC I und II der adulten *Schistocerca gregaria* nach Vitzthum und Homberg (1998).

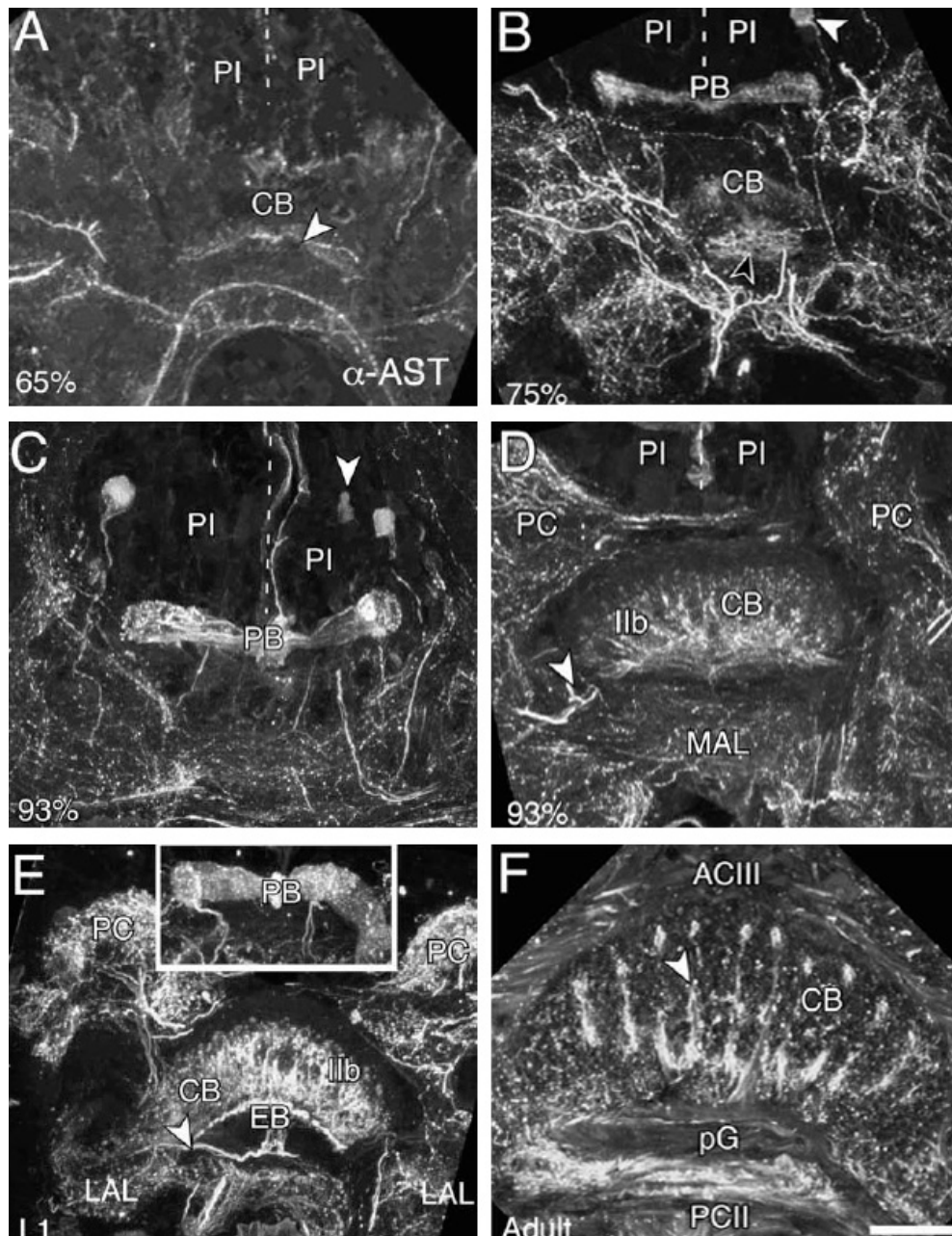
Bei 80% der Entwicklung verstärken sich die *LomTK*-Immunreaktivitäten und zeigen verbreiterte Verzweigungen der Neuronen des Zentralkörpers. Auch in den medianen Teilen der akzessorischen Loben und dem posterioren Anteil der Noduli wird eine *LomTK*-Färbung sichtbar (Abbildung 41E, F). Die Färbung wird im Laufe der Embryonalentwicklung stärker, das Expressionsmuster verändert sich dagegen nicht (Abbildung 41E-G).

In frühen Larvalstadien entsteht eine starke Immunreaktivität in zusätzlichen kolumnaren Neuronen, den LTC III. Diese wird sichtbar in den Ebenen I und II des Zentralkörpers, und ebenso in den LTC IV der posterioren Furche. Das Expressionsmuster entspricht dem des adulten Tieres (Abbildung 41H, I).

5.3.2.2 Allatostatin-Immunreaktivität

Das Expressionsmuster der AST-Immunreaktivität in der adulten Heuschrecke wurde detailliert durch Vitzthum et al. (1996) beschrieben. Zusammengefasst innervieren zwei kolumnare und vier tangentialen Neuronengruppen die meisten Teile des Zentralkomplexes. Die Projektionen der ersten tangentialen Neuronen innervieren die LAL und mit seitlichen Verzweigungen den Isthmus zwischen den lateralen akzessorischen Loben und dem Zentralkörper. Sie verzweigen sich im Zentralkörper in die Ebene IIa. Die zweiten tangentialen Neuronen führen durch die lateralen akzessorischen Loben und innervieren die mediane Olive. Die Projektionen enden in einer weiteren Verzweigung in der Ebene IIb des Zentralkörpers und im weitesten anterior gelegenen Teil des ellipsoiden Körpers. Der restliche Teil des EB bleibt ungefärbt. Die dritten tangentialen Neuronen projizieren anterior in die LAL und den Zentralkörper. Sie verzweigen sich dort in die Ebenen Ib und IIb. Die vierten tangentialen Neuronen projizieren in die LTC II Zellen. Diese Neuronen enden im posterioren optischen Tuberkel und in der protocerebralen Brücke des Zentralkomplexes. Die erste Gruppe der kolumnaren Neuronen verzweigt stark in der protocerebralen Brücke und weiter durch die vier Trakte *w*, *x*, *y* und *z* in den Zentralkörper. Die LTC I wachsen durch die Ebenen Ia und Ib und enden in den lateralen akzessorischen Loben. Die zweiten kolumnaren Neuronen projizieren ebenfalls durch die vier Trakte in den Zentralkörper, befinden sich dort in der Ebene III und zusätzlich in den Noduli.

In der Embryonalentwicklung findet man die erste AST-Immunreaktivität bei 60-65%. Aufgrund der Morphologie und der Lage dieser Fasern kann es sich um die sich entwickelnden Projektionen der im adulten Tier beschriebenen AST 1 Neuronen handeln (Vitzthum et al., 1996). Die AST-Immunreaktivität ist bei 65% der Embryogenese in allen Gehirnbereichen erkennbar, jedoch am deutlichsten im Zentralkörper und in den lateralen akzessorischen Loben. Dagegen gibt es keine Immunreaktivität in der protocerebralen Brücke (Abbildung 42A).



Erklärungen zu Abbildung 42:

- Bild A:** 65% der Embryonalentwicklung.
Bild A bis D: Gehirnmittellinie
Bild B: 75% der Embryonalentwicklung.
 ► kolumnare Projektion.
 ► überkreuzende tangentielle Fasern.
Bild C: 93% der Embryonalentwicklung.
 ► kolumnare Projektionen.
Bild D: 93% der Embryonalentwicklung.
 Schnittebene ventraler als in C.
 ► Isthmus.
Bild E: Erstes Larvalstadium. ► Isthmus.
Bild F: Adulte Heuschrecke. ► Trakte.

Abkürzungen in Abbildung 42:

- PI Pars intercerebralis.
 CB Zentralkörper.
 PB Protocerebrale Brücke.
 AST Allatostatin.
 PC Protocerebrum.
 MAL medianer akzessorischer Lobus.
 EB ellipsoider Körper.
 LAL lateraler akzessorischer Lobus.
 IIb Ebene des Zentralkörpers.
 L1 erstes Larvalstadium.
 PCII sekundäre posteriore Kommissur.
 ACIII dritte anteriore Kommissur.
 pG posteriore Furche.

Bei 70% der embryonalen Entwicklung erscheinen weitere Immunreaktivitäten in den tangentialen Neuronen. Entsprechend ihrer Lage kann es sich um die Typ IV tangentialen Neuronengruppe handeln, da Verzweigungen im Zentralkörper und der protocerebralen Brücke, aber nicht in den *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakten Immunfärbungen gegen Allatostatin zeigen (Abbildung 42B). Die verzweigten horizontalen Fasern der Ebenen Ib und IIb entsprechen den von Vitzthum et al. (1996) im adulten Tier beschriebenen AST 3 Neuronen. Vermutlich exprimieren ebenfalls die AST 4 Neuronen im embryonalen Entwicklungsstadium (70%) Allatostatin, da Neuronen der protocerebralen Brücke, jedoch nicht die PI-Neuronen der Trakte gefärbt sind. Wie Abbildung 42B zeigt, konnten die AST 2 Projektionen durch ihren charakteristischen Weg durch den Isthmus, die Verschmelzung des rechten und des linken Traktes, die Projektion in die Ebene IIb des Zentralkörpers und ihre anteriore Verzweigung in das kolumnare System identifiziert werden.

Ab 75% der Embryogenese wird in allen tangentialen Projektionen AST-Immunreaktivität sichtbar, ebenso in den kolumnaren Neuronen und in deren Projektionen in die protocerebrale Brücke, in den *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakten, den Noduli und den akzessorischen Loben. Aufgrund der AST-Immunreaktivität in den Zentralkörperebenen Ia und Ib wird vermutet, dass die allatostatinexprimierenden kolumnaren Zellen (ASC)-2 die ersten im kolumnaren System sind, die Allatostatin exprimieren (Abbildung 42C, D). In der weiteren Entwicklung findet man AST-Färbung in den MAL und den Verzweigungen des Zentralkörpers. Entsprechend ihrer Lage und Morphologie könnte es sich um die ASC-1 Neuronen handeln (Vitzthum et al., 1996). Die AST-Immunreaktivität der Verzweigungen beginnt bei 60% der Embryonalentwicklung, steigert sich und ist im ersten Larvalstadium bereits so intensiv wie im adulten Tier (Abbildung 42E, F).

5.3.2.3 Periviscerokinin / Pyrokinin Immunreaktivität

Das Expressionsmuster von PVK und PK im Zentralkomplex wurde bisher nicht für die adulte Heuschrecke beschrieben. Jedoch wurden Mitglieder dieser Peptidfamilie in der Pars intercerebralis und dem retrocerebralen Komplex von *Locusta migratoria* und *Schistocerca gregaria* durch Massenspektrometrie gezeigt (Clynen et al., 2003a, b).

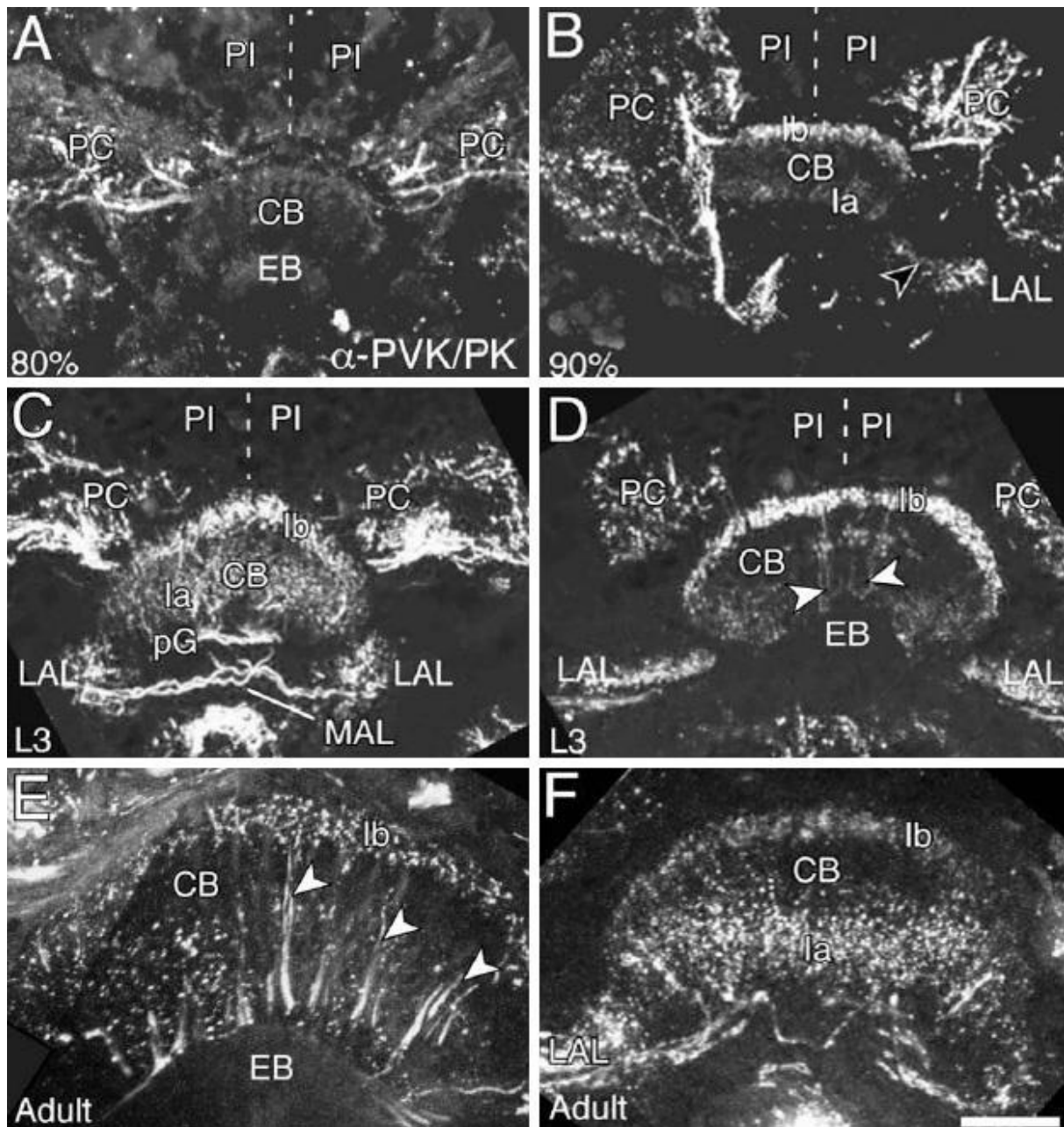


Abbildung 43: Konfokalbilder der PVK/PK-Immunreaktivität.
Maßstab: Bild A 30µm. Bild B: 35µm. Bild C bis F 60µm.

Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526. verändert.

Erklärungen zu Abbildung 43:

Bild A: 80% der Embryonalentwicklung.

Bild B: 90% der Embryonalentwicklung.

➤ Lateraler akzessorischer Lobus.

Bild C und D: Drittes Larvalstadium.

Bild D: ➤ kolumnare Projektionen.

Bild E und F: Adulte Heuschrecke.

Bild E: ➤ Trakte.

Bild A bis D: █ Gehirnmittellinie.

Abkürzungen in Abbildung 43:

PI Pars intercerebralis. PC Protocerebrum.

CB Zentralkörper. EB ellipsoider Körper.

PVK/PK Periviscerokinin/Pyrokinin.

LAL lateraler akzessorischer Lobus.

pG posteriore Furche.

MAL medianer akzessorischer Lobus.

L3 drittes Larvalstadium.

Ia, Ib Ebenen des Zentralkörpers.

Wie im Methodenteil beschrieben, färbt der verwendete Antikörper sowohl Periviscerokinin als auch Pyrokinin. Immunreaktivität wird im Zentralkomplex erst spät in der Embryonalentwicklung bei ca. 90% festgestellt. Dagegen kann im lateralen Protocerebrum bereits bei 80% eine deutliche Färbung detektiert werden (Abbildung 43A).

Im Zentralkomplex ist bei 90% der Embryonalentwicklung eine Gruppe von Zellen immunreaktiv, die über den LAL in die Ebene Ib des Zentralkörpers projiziert (Abbildung 43B). Im dritten Larvalstadium ist zusätzlich eine zweite Zellgruppe gefärbt. Diese Färbung ähnelt deutlich der des adulten Zentralkomplexes (Abbildung 43C, D). Im adulten Tier findet man Immunreaktivität von PVK/PK nur in den tangentialen Bereichen des Zentralkomplexes. Die Färbung zeigt sich in den tangentialen Neuronen der LALs und in allen Ebenen sowie in den Trakten des tangentialen Systems des Zentralkörpers. Zwei Zellgruppen aus dem inferioren Protocerebrum projizieren Axone über die lateralen akzessorischen Loben in den Zentralkomplex. Eine Gruppe nimmt dabei den Weg über die ipsilateralen LALs in die Ebene Ib des CBs, die andere Gruppe in die kontralateralen LALs. Keine Immunreaktivität findet sich dagegen in den kolumnaren Neuronen der PI, in der PB, dem EB und den Noduli (Abbildung 43E, F).

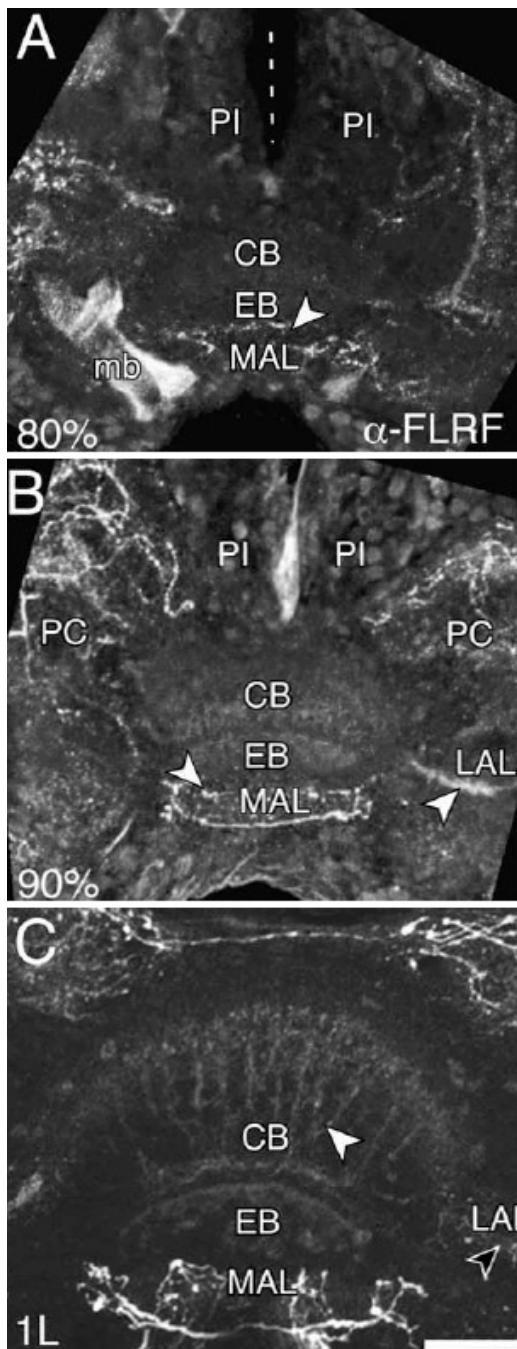
5.3.2.4 FLRFamid-Immunreaktivität

Die Immunfärbung gegen FLRFamid zeigt kein eindeutiges Ergebnis, da sich die Sequenzen von FLRFamid und dem *Schistocerca* Neuropeptid F ähneln und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Färbung das SPF aufzeigt (Clynen et. al., 2009). Die Immunhistochemie gegen FLRFamid zeigt erste Farbsignale im Zentralkomplex bei 80% der Embryonalentwicklung (Abbildung 44A).

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Massenspektrometrie in der adulten *Scg* (Abbildung 39), die Färbungen an denselben Orten und dieselbe Neuronenmorphologie zeigt, kann die FLRFamid-Immunreaktivität im Zentralkomplex bestätigt werden. Im CC sind Fasern des LAL und des MAL bei 90% der Embryogenese stark immunreaktiv. Der Zentralkörper und der ellipsoide Körper sind dagegen nur schwach gefärbt (Abbildung 44B).

Im ersten larvalen Stadium finden sich Färbungen in den tangentialen Fasern (Abbildung 44C), die sich in den kolumnaren Trakten des Zentralkörpers fortsetzt. Diese Färbungen

intensivieren sich im Laufe der Larvalentwicklung. Das Expressionsmuster weist eine deutliche Ähnlichkeit zum Muster im adulten Tier auf.



Erklärungen zur Abbildung 44:

Bild A: 80% der Embryonalentwicklung.

➤ medianer akzessorischer Lobus.

■ Gehirnmittellinie.

Bild B: 90% der Embryonalentwicklung.

➤ tangentielle Projektionen.

Bild C: Erstes Larvalstadium.

➤ tangentielle Projektionen.

➤ lateraler akzessorischer Lobus.

Abkürzungen in Abbildung 44:

PI Pars intercerebralis.

CB Zentralkörper.

EB ellipsoider Körper.

mb Pilzkörper.

MAL medianer akzessorischer Lobus.

LAL lateraler akzessorischer Lobus.

PC Protocerebrum.

1L erstes Larvalstadium.

Abbildung 44: Konfokalbilder der FLRFamid-Immunreaktivität.

Maßstab: A bis C: 50µm.

Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010).
J Morphol 271, 1509-1526.

5.3.2.5 Serotonin (5HT-ICC)-Immunreaktivität

Die Serotonin-Immunreaktivität des Zentralkörpers der adulten Heuschrecke wurde durch Homberg (1991) beschrieben. Einige serotoninimmunaktive Zellen, die S1 Zellen, aus der Pars intercerebralis projizieren über die protocerebrale Brücke und die kolumnaren *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte in die Ebene III des Zentralkörpers und zu den Noduli. Sie bilden das kolumnare serotonerge System. Außerdem existieren fünf große Neuronengruppen, die zusammen das

tangentiale serotonerge System des Zentralkomplexes bilden. Die S2 Zellen projizieren zur protocerebralen Brücke und zu den posterioren optischen Tuberkeln. Zudem gibt es im inferioren Protocerebrum S3 Neuronen, die über die lateralen akzessorischen Loben und den Isthmus-Trakt in die Ebene Ia des Zentralkörpers projizieren. Das S4 Paar im frontalen medianen Protocerebrum verzweigt in verschiedene Bereiche der Ib-Ebene des Zentralkörpers. Auch die S5 Neuronen bilden ein Paar in der posterioren Pars intercerebralis und projizieren in die Ebene Ia des Zentralkörpers. Das S6 Neuronenpaar projiziert in den kontralateralen LAL und verzweigt dort.

In der Embryogenese lässt sich erst nach 75% der Entwicklung eine Serotonin-Immunreaktivität im Zentralkomplex nachweisen. Diese intensiviert sich bei fortschreitender Entwicklung. Bei 75% der Entwicklung werden nur einige tangentielle Neuronen mit Projektionen in die protocerebrale Brücke und den Zentralkörper gefärbt.

Bei 80% der Embryonalentwicklung zeigen bereits die großen Neuronengruppen bzw. -paare S2 bis S6 eine Serotonin-Immunreaktivität (Abbildung 45A). Die S2 Neuronen projizieren in die protocerebrale Brücke, die S5 Neuronen in die LAL und in den Zentralkörper. Auch die S3, S4 und S6 Zellen zeigen Färbung im gesamten CB. Die Neuronen in den kolumnaren Trakten *w*, *x*, *y*, und *z* und in der Pars intercerebralis exprimieren kein Serotonin. Das gesamte tangentielle neuronale System zeigt zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung bereits eine intensive Immunreaktivität.

Zwischen 90 und 95% der Embryonalentwicklung verstärkt sich die Intensität der Färbung, jedoch gibt es keine Änderung im Expressionsmuster der serotonergen Neuronen. Die Intensitätssteigerung entsteht nicht durch zusätzliche Neuronen, sondern durch eine Volumenvergrößerung und eine größere Verzweigung der Neuronen des Zentralkomplexes (Abbildung 45B, C).

Erst bei 99% der embryonalen Entwicklung, kurz vor dem Schlüpfen der Larve, zeigt das kolumnare System eine Immunreaktivität. Das Muster der S1 Zellen ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgebildet (Abbildung 45D). Das Expressionsmuster entspricht dem des ersten Larvalstadiums (Abbildung 45E, F) und des adulten Tieres (Abbildung 45G bis I).

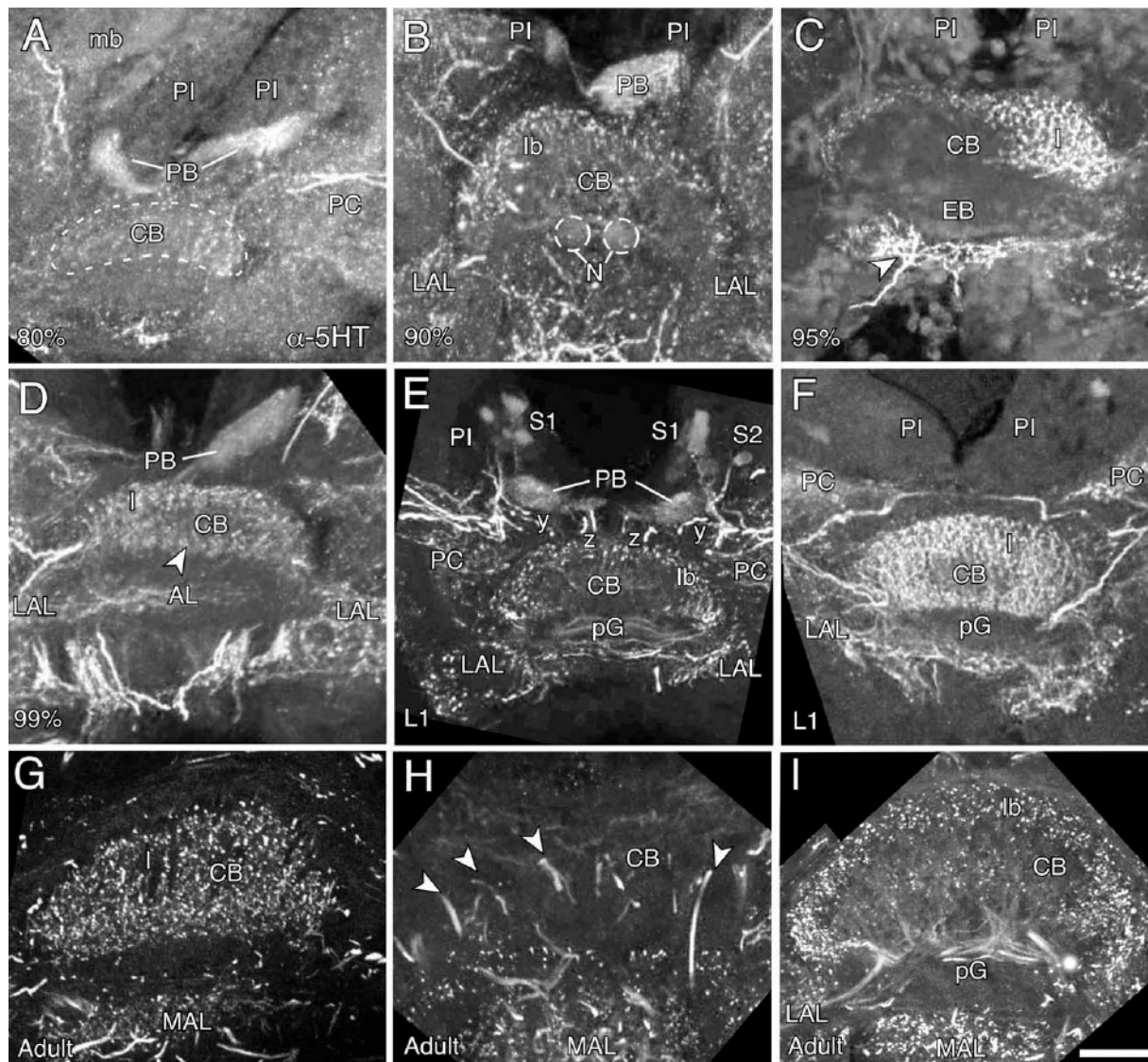


Abbildung 45: Konfokalbilder der 5HT-ICC-Immunreaktivität.
 Maßstab: Bild A und C 40µm. Bild B 30µm. Bild D-F 50µm. Bild G-I 60µm.
 Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526.

Erklärungen zu Abbildung 45:

Bild A: 80% der Embryonalentwicklung.

--- Grenze des Zentralkörpers

Bild B: 90% der Embryonalentwicklung.

--- Grenzen der Noduli.

Bild C: 95% der Embryonalentwicklung.

➤ tangentielle Projektionen.

Bild D: 99% der Embryonalentwicklung.

➤ kolumnare Projektionen.

Bild E: Erstes Larvalstadium.

Bild F: Erstes Larvalstadium.

Bild G bis I: Adultes Heuschreckengehirn.

Bild H: ➤ Trakte.

Abkürzungen in Abbildung 45:

mb Pilzkörper. PI Pars intercerebralis.

PB Protocerebrale Brücke. PC Protocerebrum.

CB Zentralkörper.

5HT-ICC Serotonin.

I, Ib Ebenen des Zentralkörpers. N Noduli.

LAL lateraler akzessorischer Lobus.

EB ellipsoider Körper. AL antennaler Lobus.

L1 erstes Larvalstadium.

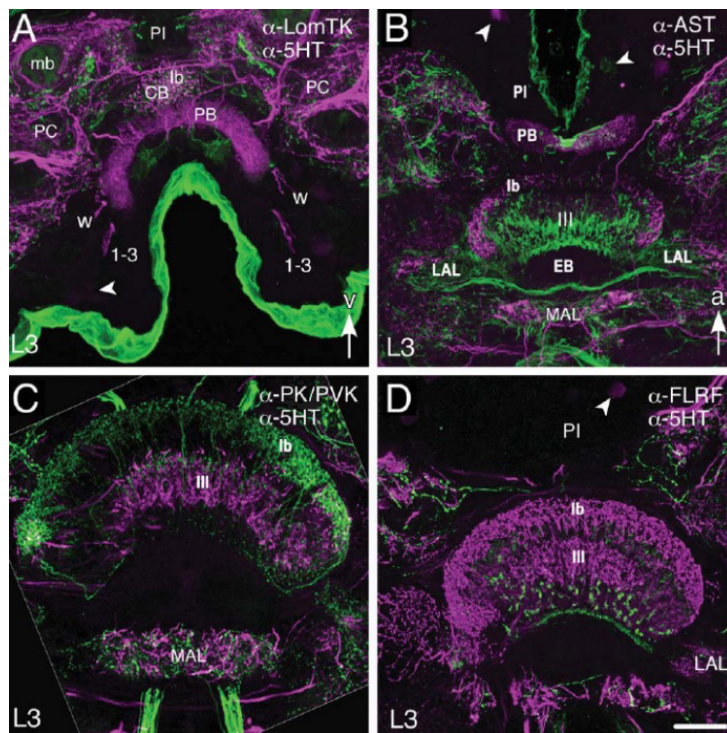
S Serotonin-exprimierende Neuronen.

y, z Trakte y, z.

pG posteriore Furche.

MAL medianer akzessorischer Lobus.

5.3.2.6 Kolokalisation von 5HT-ICC und anderen Neuropeptiden im Zentralkomplex



Legende zu Abbildung 46:

Bild A: Färbung gegen Serotonin (violett) und *LomTK* (grün).

► Projektionen der Zellgruppen 1-3.

↑ zeigt nach ventral.

Bild B: Färbung gegen Serotonin (violett) und Allatostatin (grün).

↑ zeigt nach anterior (gilt auch für C und D).

► Allatostatinpositive Verzweigungen.

Bild C: Färbung gegen Serotonin (violett) und PK/PVK (grün).

Bild D: Färbung gegen Serotonin (violett) und FLRFamid (grün).

► Allatostatinpositive Somata.

Abbildung 46: Konfokalmikroskopische Doppelfärbungen im dritten Larvalstadium.

Maßstab: A und D 70µm. B 50µm. C 75µm.

Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). *J Morphol* 271, 1509-1526. verändert.

Abkürzungen in Abbildung 46:

LomTK *Locusta migratoria*-Tachykinin. 5HT Serotonin. PI Pars intercerebralis. mb Pilzkörper.

CB Zentralkörper. L3 drittes Larvalstadium. PC Protocerebrum. w Trakt w. 1-3 Zellgruppe. AST Allatostatin.

PB Protocerebrale Brücke. v ventral. LAL lateraler akzessorischer Lobus. EB ellipsoider Körper.

PK/PVK Pyrokinin/Periviscerokin. Ib, III Ebenen des Zentralkörpers. MAL medianer akzessorischer Lobus.

a anterior. FLRF Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin.

Doppelfärbungen (Abbildung 46) zeigen mindestens bis zum dritten Larvalstadium keine Kolokalisation von Serotonin mit *LomTK* (Abbildung 46A), AST (Abbildung 46B), PK/PVK (Abbildung 46C) oder FLRFamid (Abbildung 46D). Dieses gilt sowohl für das kolumnare als auch für das tangentielle System. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den strikt voneinander getrennten Ebenen des Zentralkörpers wider (Abbildung 46D).

5.3.2.7 Histologische NADPH-Diaphorase/NO Färbung

In der Arbeit von Kurylas et al. (2005) wurden detaillierte Aktivitätsmuster von NO bzw. der NADPH-Diaphorase in der adulten Heuschrecke beschrieben. Insgesamt wurden 170 Neuronen in den tangentialen, kolumnaren und pontinen Anteilen des Zentralkomplexes identifiziert, die in sechs Neuronentypen gruppiert werden können. Etwa 50 dieser Neuronen der Pars intercerebralis werden dem kolumnaren NO-System zugeordnet. Die Hauptneuronen projizieren über die protocerebrale Brücke, über die *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte in die Ebene III

des Zentralkörpers und weiter bis in die Noduli. Das tangentiale Neuronenpaar TL1 des tangentialen Systems befindet sich im ventralen medianen Protocerebrum, projiziert in die LTs und die LALs und über den Isthmus weiter in den ellipsoiden Körper. Die zweite tangentiale Neuronengruppe TL2 ist im medianen Protocerebrum lokalisiert. Sie verzweigt ebenso wie die TL1, dringt jedoch ventraler in den ellipsoiden Körper ein. Die dritte tangentiale Neuronengruppe TL3 verzweigt in die posterioren optischen Tuberkel und in die protocerebrale Brücke. Etwa zwanzig Somata befinden sich posterior zur PB. Entlang des *w*-Traktes projizieren vier tangentiale Neuronengruppen, bestehend aus sechs bilateralen Neuronenpaaren, die in den LAL und in der Ebene II des Zentralkörpers verzweigen. In der primären posterioren Kommissur, in der Ebene II des Zentralkörpers und am anterioren Rand befindet sich die fünfte tangentiale Neuronengruppe, deren Somata und die der vierten tangentialen Neuronengruppe, deren Somata teilweise noch lokalisiert werden müssen. Die pontine Neuronengruppe, bestehend aus 45 Zellkörpern in der Pars intercerebralis, projiziert in die Ebenen I und IIb des Zentralkörpers und verbindet die Kolumnen dieser Ebenen.

Bei 70% der Embryonalentwicklung wird erstmals NO im Zentralkomplex exprimiert. NADPH-Diaphorase-Aktivität findet sich im Zentralkörper, im Isthmus des tangentialen Systems TL1 und in den lateralen akzessorischen Loben. Zudem zeigt sich NO-Expression außerhalb des Zentralkomplexes in Zellkörpern des Protocerebrums und der Pars intercerebralis (Abbildung 47A).

NO-Färbung zeigt sich bei 73% der Embryogenese in der Ebene IIb des Zentralkörpers, im ellipsoiden Körper, in den LALs, dem Isthmus-Trakt des tangentialen Systems und in feinen Fasern der ventralen Furche (Abbildung 47B).

In den kolumnaren Neuronen der Pars intercerebralis, in der protocerebralen Brücke, in den kolumnaren *y*- und *z*-Trakten, in der Ebene III des Zentralkörpers und im Isthmustrakt, dem tangentialen System TL2 und der posterioren Furche zeigt sich bei 75% der Entwicklung NADPHd-Aktivität (Abbildung 47C).

Im Vergleich der Abbildung 47C (75%) und Abbildung 47D (80%) zeigt sich ein ähnliches Aktivitätsmuster, jedoch verstärken sich die Färbungen in den Zellkörpern der Pars intercerebralis und deren Projektionen im Zentralkörper kontinuierlich. Die NADPHd-Aktivität in der Ebene III des Zentralkörpers beginnt zeitgleich und mit derselben Intensität in den lateralen und medialen Bereichen des Zentralkomplexes.

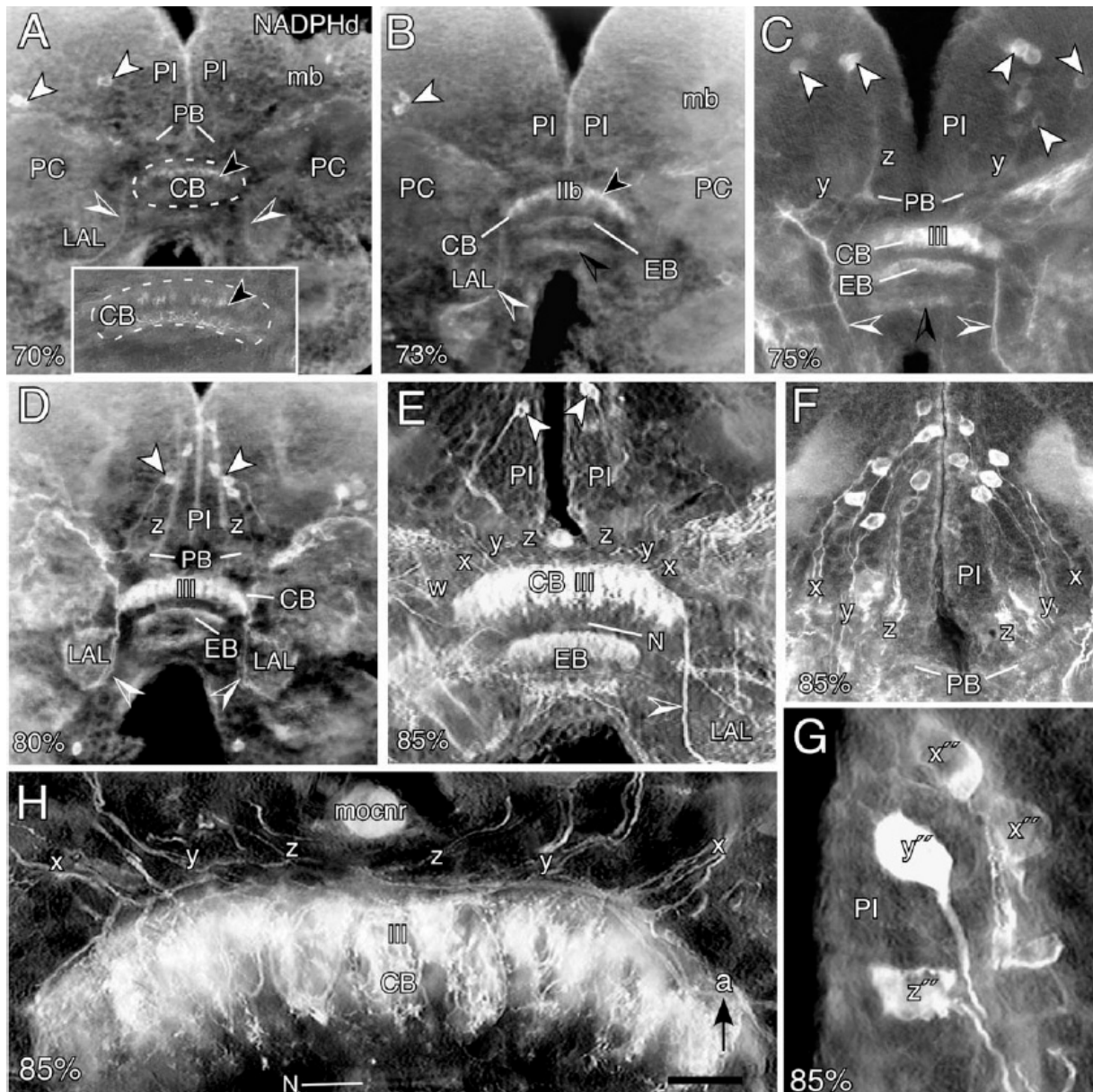


Abbildung 47: Mikroskopische Aufnahmen der Expressionsmuster von NADPHd.
 Maßstab: Bild A 112µm. eingesetztes Bild 45µm. Bild B, C 75µm. Bild D 63µm. Bild E 50µm. Bild F 35µm. Bild G 10µm. Bild H 16µm.
 Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526.

Erklärungen zu Abbildung 47:

Embryonalentwicklung:

Bild A 70%.

Bild B 73%.

Bild C 75%.

Bild D 80%.

Bild E-H 85%.

Bild A --- Grenze des Zentralkörpers.

Bild A-E: ▢ pontine Neuronen.

▢ Zellgruppen in der PI.

▢ Isthmus.

Bild A-H: ↑ Blickrichtung anterior

Abkürzungen in Abbildung 47:

NADPHd Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Diaphorase.

PI Pars intercerebralis. mb Pilzkörper.

PB protocerebrale Brücke.

PC Protocerebrum. CB Zentralkörper.

LAL lateraler akzessorischer Lobus.

EB ellipsoider Körper.

IIb, III Ebenen des Zentralkörpers.

N Noduli.

w, x, y, z Trakte w, x, y, z.

mocnr Nervenfasern des medianen Ocellus.

x'', y'', z'' Somata der Trakte.

Bis 85% der Embryonalentwicklung (Abbildung 47E bis H) verstärkt sich die Aktivität in folgenden Zentralkomplexteilen:

- w -, x -, y - und z -Trakte
- Ebene III des Zentralkörpers
- ellipsoider Körper
- Isthmus-Trakt.

Dieses Muster entspricht dem des adulten Tieres wie von Kurylas et al. (2005) beschrieben. Einzelne Zellen der Trakt-Zelllinien x , y und z können identifiziert werden (Abbildung 47H) und verzweigen über die kolumnaren Trakte w , x , y und z in die Ebene III des Zentralkörpers. Außerdem ist NADPHd-Aktivität in den Noduli (Abbildung 47E, H) zu sehen.

6 Diskussion

Der Zentralkomplex von Insekten ist ein hochkomplexes Neuropil mit vielfältigen Funktionen in der Verarbeitung von Ortsinformationen und Sinneseindrücken. Der Aufbau dieses Gehirnbereichs und die dort exprimierenden Neuromodulatoren im adulten Heuschreckengehirn wurden bereits beschrieben, jedoch fehlen umfassende Informationen zur embryonalen Gehirnentwicklung.

Neuropile entstehen aus neuronalen Vorläuferzellen und deren Nachkommen. In dieser Arbeit werden die an der Bildung der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Zentralkörpertrakte beteiligten Neuroblasten identifiziert und deren Entwicklung in der Embryogenese beschrieben. Zudem wurde im ersten Teil der Arbeit der charakteristische Aufbau der Trakte in Abhängigkeit zum Entstehungszeitpunkt der beteiligten Axone dargestellt.

Komplexe Neuropile orientieren sich bei ihrer embryonalen Entwicklung an einem Grundgerüst im Gehirn, das aus Axonen und Gliazellen besteht. Pionierzellen wie die Lateralen Zellen und die Pioniere der protocerebralen Kommissur bilden die ersten Teile dieser Leitstruktur. Die Entwicklung, Ausdifferenzierung und Wanderungen der beiden genannten Zelltypen wurden im zweiten Teil der Arbeit beschrieben.

Abschließend erfolgte eine Analyse der Entwicklungen von embryonalen Expressionsmustern verschiedener Neuromodulatoren und Botenstoffen.

6.1 Entwicklung der *w*-, *x*-, *y*-, *z*-Trakte im embryonalen Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria*

Wie im Vertebratengehirn gibt es auch im Insektengehirn verschiedene Regionen, die sich in ihrer Neuroarchitektur und Komplexität unterscheiden (Bullock und Horridge, 1965; Strausfeld, 1976, 2012; Kandel et al., 1991). Zu den komplexen Regionen im Insektengehirn gehören die Pilzkörper (Strausfeld; 1976, 2012; Strausfeld et al., 1998), der Zentralkomplex (Williams, 1975, Loesel et al., 2002; Strausfeld, 2012) und die optischen Loben (Strausfeld, 1976, 2012). Alle genannten Neuropile sind modular aufgebaut (Leise, 1990; Mizunami et al., 1997; O'Shea et al., 1998; Strausfeld et al., 1998; Strausfeld, 1998, 2012). Um die Jahrtausendwende wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Hypothese aufgestellt, dass

die modulare Entwicklung entlang von klonalen Zelllinien stattfindet (Boyan und Williams, 1997; Tettamanti et al., 1997; Renn et al., 1999; Farris und Sinakevitch, 2003). Es wurde gezeigt, dass an der Entwicklung der Pilzkörper vier Neuroblasten beteiligt sind. Jeder dieser Neuroblasten bildet einen spezifischen Satz von Neuronen und Gliazellen. Aus den vier NBs bilden sich die vier Einheiten der Pilzkörper (Ito et al., 1997). Die Grobstruktur der Pilzkörper variiert bei den einzelnen Arthropodenfamilien (Bullock und Horridge, 1965; Howse und Williams, 1969; Strausfeld et al. 1998; Strausfeld, 1998, 2012), obwohl sie modular durch klonale Zelllinien aufgebaut werden (Ito et al., 1997).

Obwohl sich die Grundstruktur des Zentralkomplexes, also der Aufbau aus den fünf beschriebenen Teilen, bei den Insektenspezies ähnelt, unterscheidet sich die Feinstruktur, das Volumen und die Zahl der Kolumnen zwischen den Arten (Strausfeld, 2012). Dies ermöglicht die Anpassung der einzelnen Insektenspezies an die unterschiedlichen Lebensweisen (Howse und Williams, 1969; Loesel, et al., 2002; Strausfeld, 2012). Auch auf biochemischer Ebene (vgl. Abbildung 14) zeigen die Expressionsmuster von Neurotransmittern, Peptiden und anderen Botenstoffen wie NO in Heuschrecken eine modulare Neuroarchitektur des Zentralkomplexes auf (Homberg, 1987, 1991, 2002; Vitzthum et al., 1996; Loesel et al., 2002).

Die modular aufgebauten w-, x-, y- und z-Trakte des Zentralkomplexes in Heuschreckengehirnen zeigen untereinander in ihrer Morphologie eine große Ähnlichkeit (vgl. Abbildung 6). Bei einem Vergleich des Zentralkörpers des holometabolen Insekts *Drosophila melanogaster* und der hemimetabolen *Schistocerca gregaria* scheint dessen Aufbau in der Evolution konserviert (Strausfeld, 2012). Obwohl die genannten Insekten und deren Gehirne sich unterschiedlich entwickeln und Neuropile sich in differierenden Entwicklungsstadien bilden, entsteht eine sehr ähnliche Morphologie des Zentralkomplexes. Bei allen Insekten besteht der Zentralkomplex aus den fünf beschriebenen Teilen, jedoch können die einzelnen Module ein unterschiedliches Aussehen zeigen (Strausfeld, 2012). Dabei ziehen Projektionen von Axonen präzise von identifizierten Zellgruppen der Pars intercerebralis in die Kommissuren des Protocerebrums. Die Zellgruppen sind bilateral symmetrisch. Die Ursprungs- und Zielorte der Projektionen sind immer gleich (Williams, 1975; Homberg, 1987, 1991, 2002; Boyan et al., 1993; Vitzthum et al., 1996; Boyan und Williams, 1997). Es liegen bereits zahlreiche und umfassende Studien zu den Trakten des Zentralkörpers des adulten Arthropodengehirns vor, zur embryonalen Ontogenie bis dato nur die von Boyan und Williams (1997). Die Ausbildung dieser Struktur findet in hemimetabolen Insekten, zu welchen *Schistocerca gregaria* gehört,

im Embryo statt. Der modulare Aufbau (vgl. Abbildung 4) ist bereits bei 85% der Embryonalentwicklung sichtbar (Boyan und Williams, 1997). In holometabolen Insekten wie *Drosophila melanogaster* findet die Ontogenie des Zentralkomplexes in späten Larvalstadien statt. Die Bildung dieses Neuropils wird erst im adulten Tier vollendet (Renn et al., 1999).

Boyan und Williams identifizierten 1997 vier protocerebrale Neuroblasten, die durch ihre Position zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung, durch ihre Orientierung und das Wachstum ihrer Nachkommen in eine bestimmte Richtung als Vorläuferzellen der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte in Frage kommen (Boyan und Williams, 1997). In der genannten Studie wurden jedoch keine Analysen der Entwicklungslinien der Neuroblasten und keine Beschreibung von deren Aufbau aus Vorläufer- und Nachkommenzellen durchgeführt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Modell der Bildung der kolumnaren Trakte beschrieben: In der Embryogenese entwickeln sich aus Nachkommenzellen bestimmter protocerebraler Neuroblasten Axone, deren Wachstumsrichtung und Zielort von ihrem Entstehungszeitpunkt abhängt. Daraus bildet sich der charakteristische Aufbau der vier Trakte des Zentralkörpers der Heuschrecke.

6.1.1 Kartierung der protocerebralen Neuroblasten analog zur Karte des ventralen Bauchmarks

Dass die vier von Boyan und Williams (1997) gefundenen NBs zur Bildung der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte beitragen, konnte bestätigt werden. Dazu war die Analyse und Überarbeitung der Neuroblastenkarte von Zacharias et al. (1993) nach topologischen Aspekten notwendig. In dieser Karte werden alle Neuroblasten aufgezählt, jedoch erfolgte die Zuordnung zu den einzelnen Neuromeren ausschließlich aufgrund der sichtbaren Lage der einzelnen NBs. Die Einordnung bezüglich spezifischer molekularer Kriterien wurde dabei nicht berücksichtigt (Broadus et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1996, 1997; Meinertzhagen et al., 1998; Boyan und Williams, 2000, 2002; Urbach und Technau, 2003; Urbach et al., 2003a, 2003b). Die Einordnung der Neuroblasten erfolgte bei der Kartierung durch Zacharias et al. (1993) anhand der relativen Lage der NBs zu bestimmten adulten Strukturen wie den antennalen oder den optischen Loben. Die Verteilung der Neuroblasten im Gehirn der Heuschrecke verändert sich jedoch während der Embryonalentwicklung durch die Vergrößerung und das Abknicken des Gehirns um annähernd 90°, durch die Entstehung komplexer Neuropile und der Wanderung eines tritocerebralen Neuroblasten um bis zu 200µm (Abbildung 9, Abbildung 49).

Damit haben strukturelle Einordnungskriterien keine Gültigkeit mehr (Boyan et al., 1995c; Boyan und Williams, 1997; Urbach und Technau, 2003). Für die Zuordnung der Neuroblasten im embryonalen Gehirn der Heuschrecke zu einzelnen Gehirnneuromeren wurde ein Antikörper gegen das Protein des Segmentpolaritätsgens *engrailed* verwendet. Dabei wurde sichtbar, dass aus Neuroblasten des Protocerebrums Nachkommen entstehen können, die deutocerebrale Strukturen bilden, so z.B. die im Deutocerebrum liegenden Antennalloben, die aus protocerebralen und deutocerebralen Anteilen bestehen (Boyan und Williams, 2000). Somit kann allein aus der Lage des Neuroblasten die Zugehörigkeit der sich entwickelnden Struktur nicht bestimmt werden.

Bei der Neuerstellung der Neuroblastenkarte wurden dieselben Kriterien wie von Bate (1976) und Doe und Goodman (1985a) verwendet:

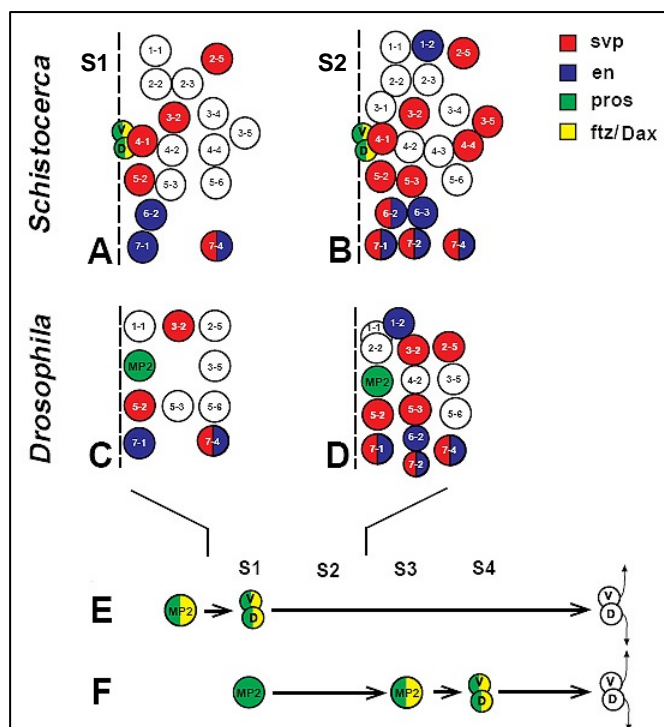
- Morphologie der einzelnen Neuroblasten
- Lage in jedem Segment
- zeitliche Abfolge ihrer Differenzierung.

Der Vergleich der genannten Kriterien in den einzelnen Segmenten ermöglicht es, Homologien zwischen den einzelnen Zellen zu zeigen (Broadus und Doe, 1995; Urbach und Technau, 2003), wie in Abbildung 48 und Abbildung 49 ersichtlich. Diese Vorgehensweise gilt derzeit als Standard für die Neuroblastenanalyse (z.B. *Ethmostigmus rubripes*: Whittington et al., 1991; Crustaceen: Whittington et al., 1993; Insekten: Broadus et al. 1995; Doe und Skeath, 1996; Buescher et al., 2002; Harzsch, 2003).

Die Neuanalyse der Neuroblasten ergab: Von anterior-medial nach posterior-lateral fanden sich je protocerebraler Gehirnhälfte 95 Neuroblasten (Abbildung 19 bis Abbildung 23), die ebenso wie die Neuroblasten im Bauchmark (Bate, 1976; Doe und Goodman, 1985a) in sieben Reihen angeordnet sind. Zacharias et al. (1993) beschrieben 86 zum Protocerebrum gehörende Neuroblasten. Die zusätzlich gefundenen neun Neuroblasten befinden sich am weitesten posterior an der Grenze zum Antennallobus und wurden ursprünglich dem Deutocerebrum zugeordnet (Abbildung 19, Abbildung 20). Ergebnisse von molekularen Untersuchungen, z.B. das Expressionsmuster des Proteins des Segmentpolaritätsgenes *engrailed* ergaben, dass Segmentgrenzen neu beschrieben und festgelegt werden mussten (Boyan und Williams, 2000). Damit ergab sich die Notwendigkeit, in dieser Arbeit die Zuordnung von Neuroblasten zu Protocerebrum bzw. Deutocerebrum neu zu definieren (Abbildung 19, Abbildung 20). Aktuell wird durch die molekulare Zuordnung von 96 protocerebralen Neuroblasten ausgegangen (Boyan und Williams, 2011).

Durch 3D-Rekonstruktionen der Färbeergebnisse (Abbildung 21 bis Abbildung 23) wird deutlich, dass die Neuroblastenreihen im Gehirn, ebenso wie im Bauchmark, gerade verlaufen (Doe und Goodman, 1985a), die Reihen jedoch nach dorso-posterior gebogen erscheinen, da dieser Bogen der Krümmung der Gehirnhemisphäre entspricht. Es bestehen zudem Zwischenräume, die später durch andere komplexe Neuropile wie den Pilzkörpern (nach 50% der Embryonalentwicklung) ausgefüllt werden (Scg: Boyan et al., 1995a, b, c; Coleoptera: Urbach et al., 2003a, b).

Die vorgeschlagene Neuroblastenkarte ist ein erneuter Versuch der Beschreibung der Neuroblastenanordnung. Es ist zum gegebenen Zeitpunkt sehr aufwendig ein Standardmodell zu etablieren, da die Neuroblastenzahl in einer Hemisphäre des Protocerebrums dreifach höher ist als die in einem thorakalen Hemiganglion des ventralen Bauchmarks und die Neuroblastenreihen geradlinig verlaufen, jedoch durch die Krümmung der Gehirnoberfläche gebogen erscheinen.



Erklärungen zu Abbildung 48:

A und B zeigen *Scg*. C und D zeigen *Drosophila*.

A und C zeigen Segment 1.

B und D zeigen Segment 2.

○ Neuroblast.

Abkürzungen in Abbildung 48:

svp seven-up.

en engrailed.

pros prospero.

ftz/Dax fushi tarazu/Dax.

A, C: S1 Entwicklungsstadium.

B, D: S2 Entwicklungsstadium.

E, F: S1 bis S4 Neuroblastenstadien.

MP mediane Vorläuferzelle.

v ventraler Nachkommen eines Neuroblasten.

d dorsaler Nachkommen eines Neuroblasten.

Abbildung 48: Genexpressionenmuster von Neuroblasten und deren Nachkommen im Bauchmark von *Drosophila* und *Schistocerca*
Quelle: Broadus, Doe (1995). Development 121, 3989-3996. verändert.

Eine Möglichkeit der Zuordnung von Neuroblasten zu den einzelnen Gehirnneuromeren ist das molekulare Markieren. Auch das Homologisieren von Neuroblasten zwischen verschiedenen Insektenarten ist durch diese Methode möglich. Broadus und Doe (1995) verwendeten diese Methode bei *Drosophila* und *Schistocerca* zur Homologisierung der Bauchmarkneuroblasten. Dabei wurden die Expressionsmuster der Genprodukte von *seven-*

up, *engrailed*, *prospero* und *ftz/Dax* in den einzelnen Neuroblasten der Segmente S1 und S2 und zusätzlich deren Entwicklungsablauf verglichen. Gleiche Lage der Neuroblasten muss nicht gleichbedeutend mit gleicher Genexpression oder gleicher zeitlicher Entwicklung sein (Abbildung 48).

Im Bauchmark von *Schistocerca gregaria* und *Drosophila* konnten Broadus und Doe (1995) homologe Neuroblasten zwischen Segmenten durch ihre Lage und ihre molekulare Ausstattung bestimmen (z.B. NB 5-2, 7-4, Abbildung 48). Auch im Vergleich der Gehirne von *Schistocerca* und *Drosophila* zeigen sich Homologien einzelner NBs (Abbildung 49).

Diese Methode bietet sich für Untersuchungen an, um Neuroblasten mit unterschiedlichen Lagen, aber gleicher molekularer Ausstattung, homologisieren zu können. Derzeit wird diese Methode von Boyan und Liu auf die Gene *seven-up* und *deadpan* und der Expression ihrer Proteine in Neuroblasten von *Schistocerca gregaria* angewendet (persönliche Informationsübermittlung, 2013).

Aber auch im Gehirn können durch die Lage und die Anzahl der Neuroblasten Homologien zwischen Insektenarten (Abbildung 49) angenommen werden (Urbach und Technau, 2003). Wie bereits beschrieben, ist die Untersuchung der Gehirnneuroblasten durch eine größere Anzahl und einer komplexeren Anordnung schwieriger als die Untersuchung der Bauchmarkneuroblasten. Dennoch kann man durch das Vorhandensein von Gehirnneuroblastenkarten verschiedener Insektenarten unterschiedliche Aspekte der Neuroblastenentwicklung vergleichen (Abbildung 49). Urbach und Technau verglichen 2003 Charakteristika (siehe Aufzählung) der Gehirnneuroblasten von *Drosophila melanogaster* (Diptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Schistocerca gregaria* (Orthoptera), *Carausius morosus* (Orthoptera), *Periplaneta americana* (Blattodea) und erhielten folgende Ergebnisse:

- Ort des Beginns der Neurogenese im Gehirn: Entstehung der ersten Neuroblasten im interkalaren und mandibularen Segment
- Ausbreitung der Neuroblasten bei der Entwicklung erscheint durch die morphologischen Gegebenheiten gebogen, realer Verlauf ist geradlinig
- Anordnung der NBs: ungeordneter als im VNC
- Wanderung eines einzelnen tritocerebralen Neuroblasten (rote Pfeilspitze, Abbildung 49)

- Anzahl der Neuroblasten gesamt: in Orthoptera, Blattodea und Coleoptera keine signifikanten Unterschiede (120-130), in *Drosophila* 106, trotz stark unterschiedlicher Gesamtneuronenzahlen im Gehirn: 200.000 bis 1.200.000
- prozentuale Verteilung der Neuroblasten zwischen den Neuromeren ist bei den verglichenen Insektenarten gleich.

Es können homologe Neuroblasten bestimmt werden, jedoch ist die gleiche Lage der NBs nicht immer gleichbedeutend mit einer Homologie untereinander, da die Neuroblasten unterschiedliche molekulare Ausstattungen haben können (Broadus und Doe, 1995; Urbach und Technau, 2003). Homologien können, wie bereits oben erwähnt, durch molekulare Markierungsversuche nachgewiesen werden.

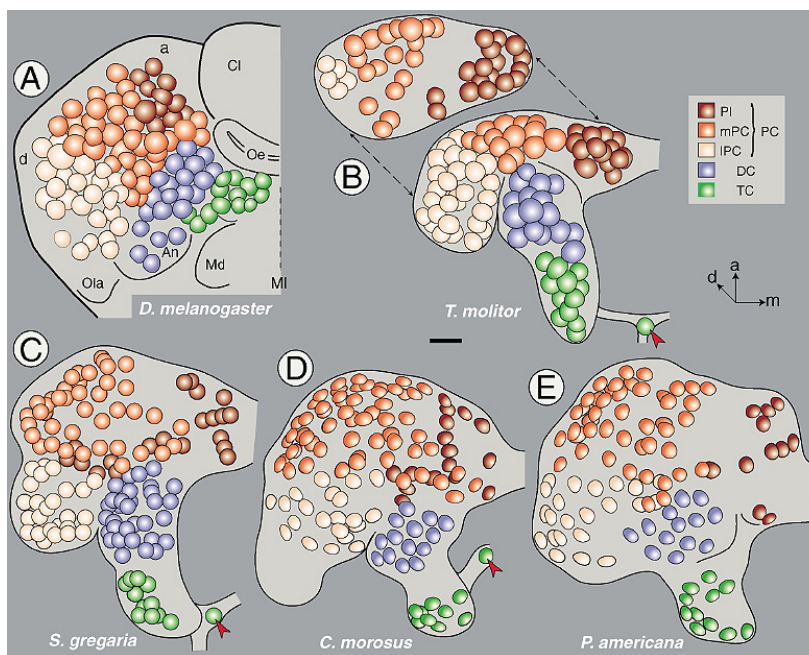


Abbildung 49: Vergleich räumliche Verteilung der Gehirnneuroblasten in fünf Insektenarten. Maßstab: A 18µm. B 25µm. C D E 50µm. Quelle: Urbach, Technau (2003). Arthropod Struct Dev 32, 103-123.

Erklärungen zu Abbildung 49:

Bild A: *Drosophila melanogaster*

35% entspricht Stadium 11.

Urbach et al., 2003b.

Bild B: *Tenebrio molitor* 40%.

Urbach et al., 2003a.

➤ Wandernder tritocerebraler Neuroblast.

Bild C: *Schistocerca gregaria* 45%.

Zacharias et al., 1993.

➤ Wandernder tritocerebraler Neuroblast.

Bild D: *Carausius morosus* D2.

Malzacher 1968.

➤ Wandernder tritocerebraler Neuroblast.

Bild E: *Periplaneta americana* E2.

Malzacher 1968.

Abkürzungen in Abbildung 49:

PI Pars intercerebralis. mPC medianes Protocerebrum. IPC laterales Protocerebrum. PC Protocerebrum.

DC Deutocerebrum. TC Tritocerebrum. An Anhang Antenne. Md Anhang Mandibel. Ola Anlage Optischer Lobus.

Cl Anhang Clypeolabrum. Oe Oesophagus. MI Mittellinie. d dorsal. a anterior. m median.

Die auffällige Ähnlichkeit der Lage der Neuroblasten, die zu den Trakten des Zentralkörpers beitragen, deutet ebenfalls auf eine homologe Entwicklung des Zentralkomplexes bei den in Abbildung 49 aufgezeigten Insektenarten hin (Abbildung 50).

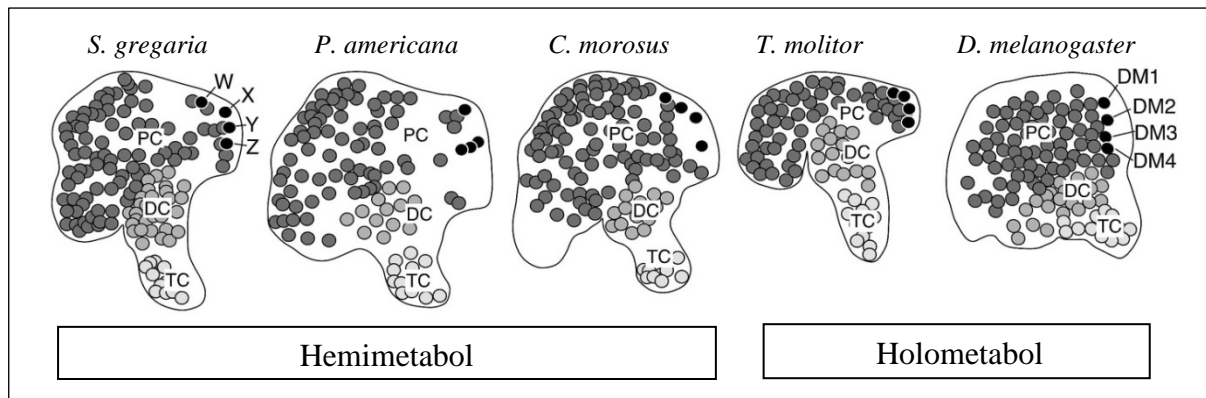


Abbildung 50: Vergleich der Neuroblasten, die zu den Trakten des Zentralkomplexes beitragen, bei fünf Insektenarten.
Quelle: Boyan, persönliche Kommunikation 2013.

Erklärungen Abbildung 50:

- schwarze Neuroblasten der Trakte des Zentralkörpers.
- dunkelgrau protocerebrale Neuroblasten.
- mittelgrau deutocerebrale Neuroblasten.
- hellgrau tritocerebrale Neuroblasten.

Abkürzungen Abbildung 50:

- PC Protocerebrum.
- DC Deutocerebrum.
- TC Tritocerebrum.
- W, X, Y, Z, Scg-Neuroblasten.
- DM1, DM2, DM3, DM4 Neuroblasten von *Drosophila*.

Die Schlussfolgerungen aus dem Vergleich der Neuroblastenkarten verschiedener Insektenarten lauten:

- Sowohl evolutiv nah stehende, als auch entfernt stehende Insektenarten zeigen homologe Anordnungen der Gehirnneuroblasten.
- Gleichartige NBs generieren gleichartige Neuropile im adulten Tier.

Damit handelt es sich um universale Entwicklungsmechanismen im Insektenreich, die früh in der Evolutionsgeschichte entstanden sind.

6.1.2 Entwicklungslinien von Gehirnneuroblasten, die zum Zentralkomplex beitragen

Frühere Untersuchungen beschreiben meist die Neuroblastenorganisation im Insektengehirn, jedoch selten Analysen der Zelllinienentwicklung (Malzacher, 1968; Zacharias et al., 1993; Younossi-Hartenstein et al., 1996, 1997; Urbach und Technau, 2003; Urbach et al., 2003a, b). Die Entwicklungsanalysen der Linien sind essentiell, um die Neuroblasten, die die w-, x-, y- und z-Trakte bilden, zu finden.

Für diese Arbeit wurden iontophoretische Markierungen, immunzytochemische und histologische Methoden verwendet, um die Entwicklung der Neuroblastenlinien über den Zeitraum von 31% bis 50% der Embryogenese detailliert beschreiben zu können (Abbildung

24 bis Abbildung 27, Abbildung 30). Dabei wurden vier protocerebrale Neuroblasten 1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y), 4-1 (Z) je Gehirnhemisphäre identifiziert, die die Vorläuferzellen der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte bilden (Abbildung 30 bis Abbildung 32). Die Neuroblasten bilden Entwicklungslinien über Ganglionmutterzellen, die Nachkommenzellen hervorbringen. Diese Nachkommen bilden Axone, die sich zu Trakten bündeln.

Die Nachkommen des Neuroblasten 4-1 (Z) tragen zur Axonbildung des *z*-Traktes bei (Abbildung 30). Das Aussehen des *z*-Traktes bei ca. 37% der Embryonalentwicklung ähnelt dem des Adulten stark (Abbildung 14, Abbildung 31), jedoch nimmt die Anzahl der Axone im Laufe der Entwicklung noch deutlich zu (Williams und Boyan, 2008). Bei 50% lässt sich die Entwicklungslinie der Z-Zellgruppe gut erkennen und beschreiben, wie in dieser Arbeit dargestellt wird. Der vollständige charakteristische, säulenartige Aufbau des Zentralkörpers ist bei 80% der Embryogenese erkennbar (Boyan und Williams, 1997; Boyan et al., 2008a). In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Axone der ersten Pioniere dieses Clusters bereits bei ca. 34% der Embryonalentwicklung die Gehirnmittellinie erreichen. Der jeweils erste Nachkomme der W-, X-, Y-, Z-Neuroblasten ist eine Zelle, die das erste Axon generiert, welches in die protocerebrale Kommissur projiziert. Die PCC bildet mit anderen Axonen eine Leitstruktur für die Bildung der Trakte des Zentralkomplexes. Die ersten Nachkommen der Neuroblasten der Trakte bilden die ersten Axone ihres jeweiligen Traktes (Williams und Boyan, 2008; Boyan et al., 2008a).

Durch die Tatsache, dass eine Diaphorase-Färbung die Anwesenheit von NO in Axonen der embryonalen Trakte des Zentralkomplexes zeigt (Abbildung 4) und bekannt ist, dass NO die Wachstumskegel der Pionierfasern reguliert (Seidel und Bicker, 2002), bietet sich in NO ein potentiell Molekül an, das für die Axonlenkung im Zentralkomplex zuständig sein könnte (siehe 6.3.3.6).

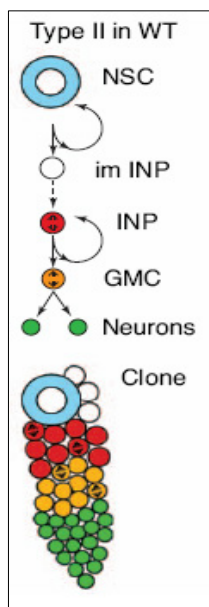
6.1.3 Entwicklungsalter-Abhängigkeit der Anordnungen der Axonprojektionen der *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte

Bei der Untersuchung der axonalen Projektionen der Zellgruppe des 4-1 (Z) Neuroblasten wurde eine klare Beziehung zwischen der Position des Axons im *z*-Trakt und dessen Zellkörper im Z-Cluster festgestellt (Abbildung 31). Die Anordnung der Axone wird durch das Alter der Zellen bestimmt. Die ältesten Zellen und Axone befinden sich apikal und sind, wie oben beschrieben, die Pioniere der Zentralkörpertrakte, die jüngsten sind basal lokalisiert

und damit am nächsten an ihrem Neuroblasten. Zusätzlich zur säulenartigen Wachstumsrichtung der Abkömmlinge von Neuroblasten wurden auch lateral gerichtete Teilungen beobachtet, die durch die Entwicklungsweise des NSC II-Neuroblasten erklärt werden kann (Williams und Boyan, 2008; Boyan und Williams, 2011; Review: Boyan und Reichert, 2011).

Die Reihenfolge, in der eine NSC ihre Nachkommen generiert ist stereotyp (Bate, 1976; Taghert et al., 1984; Doe und Goodman, 1985a, b; Whittington et al., 1991, 1993; Doe und Skeath, 1996; Boyan et al., 2010b). Auch die anatomische, elektrophysiologische und biochemische Ausstattung einer Zelle hängt vom Entstehungszeitpunkt ihres jeweiligen Neuroblasten ab (Goodman et al., 1980). Diese Altersabhängigkeit der 4-1 Zellgruppe, die aus einer NSC des Typs II entsteht, wird in dieser Arbeit bestätigt. Auch die Entwicklungen der anderen Trakte scheinen altersabhängig zu sein, was in Abbildung 32 dargestellt wird.

Die Entwicklung des Zentralkomplexes erfolgt in einem kurzen Zeitraum zwischen ca. 30% (erste Neuroblasten) und 70% (erste Anzeichen für Neuroblastenapoptose) der Embryonalentwicklung (Zacharias et al, 1993; Boyan et al., 1995c; Boyan und Liu, 2014). In dieser Zeit müssen aus wenigen Neuroblasten eine große Anzahl an Neuronen generiert



werden. Dafür ist der NSC II Typ der neuronalen Vorläuferzellen notwendig (*Drosophila*: Bello et al., 2008; Boone und Doe, 2008; *Scg*: Boyan et al., 2010b; Review: Boyan und Reichert, 2011). Die Neuroblasten 1-1 (W), 2-1 (X), 3-1 (Y) und 4-1 (Z), die die Trakte bilden, gehören zu diesem NSC II-Typ. Im Gegensatz dazu werden alle anderen Neuroblasten,

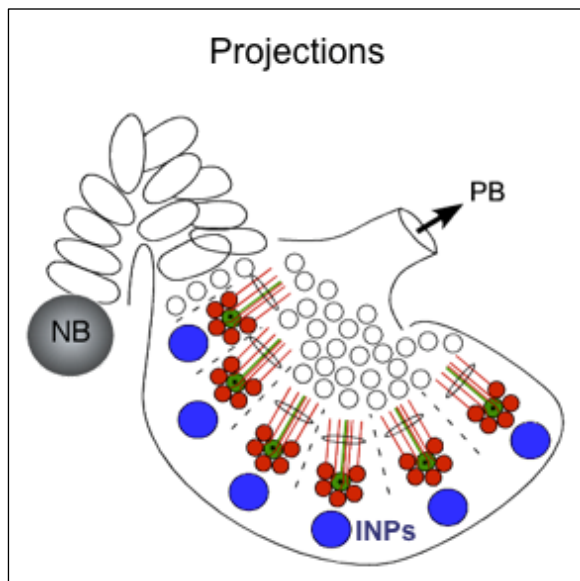
Abkürzungen in Abbildung 51:

WT Wildtyp *Drosophila*.
 NSC Neuronale Vorläuferzelle.
 INP Zwischenvorläuferzelle.
 GMC Ganglionmutterzelle.

Abbildung 51: Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen NSC Typ II in *Drosophila*.
 Quelle: Boyan, Reichert (2011). Trends Neurosci 34, 247-257.

die zur Bildung des Zentralkomplexes beitragen, dem NSC I-Typ zugerechnet. Die NSC II teilt sich in eine Ganglionmutterzelle, erneuert sich selbst und generiert zudem sogenannte Intermediate Neural Progenitors (INPs), die wiederum mehrere Ganglionmutterzellen generieren (Abbildung 51). Dieser Mechanismus bringt aus einem Neuroblasten ausreichend

Ganglionmutterzellen und damit Nachkommenzellen (bis zu 100) für die Entwicklung des Zentralkomplexes hervor und erklärt auch die laterale Teilungsrichtung bzw. die entstehenden a-, b-, c- und d-Zellpopulationen der Zentralkörpertrakte (Boyan und Reichert, 2011).



Erklärungen zu Abbildung 52:

Individuelle funktionelle Einheiten innerhalb einer NSCII-Typ-Entwicklungslinie.

● Serotoninnegative Nachkommen.

⊕ Serotoninpositive Nachkommen.

● Zwischenvorläuferzellen.

Abkürzungen in Abbildung 52:

PB Protocerebrale Brücke.

NB Neuroblast.

INPs Zwischenvorläuferzellen.

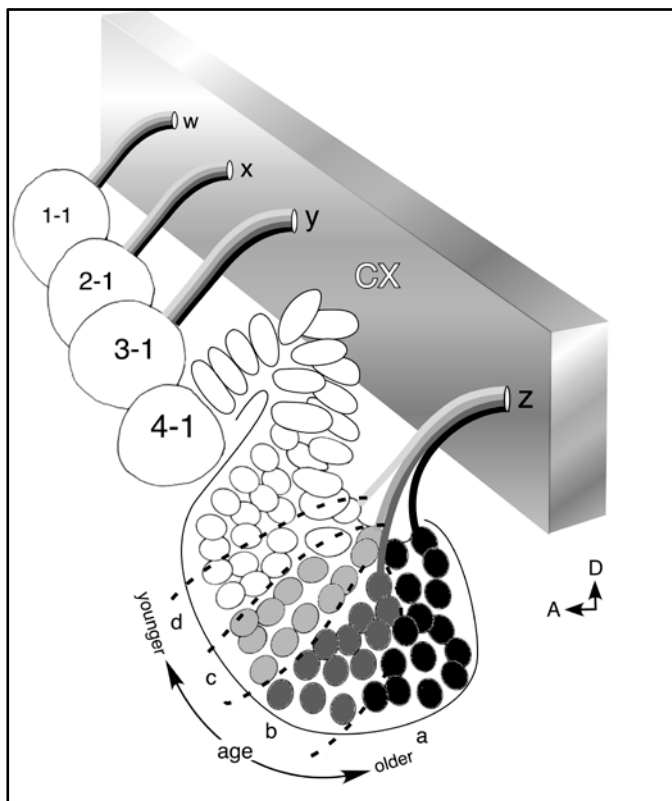
Abbildung 52: Entwicklungsrichtung der INPs in einem schematisch abgebildeten Trakt des Zentralkomplexes.
Quelle: Boyan, Williams (2011). *Arthropod Struct Dev* 40, 334-348.

In Abbildung 52 wird schematisch die säulenartige Entwicklungsrichtung der INPs eines traktbildenden Neuroblasten des Zentralkomplexes gezeigt. Durch die oben beschriebene laterale Teilungsrichtung, die nur in den Clustern der W-, X-, Y- und Z-NBs vorkommt, entsteht die charakteristische Krümmung der sich zu Trakten entwickelnden Zellgruppen. Das Prinzip der Vermehrung von Zellpopulationen durch INPs wurde auch bei *Drosophila* und *Mammalia* gezeigt (Review: Boyan und Reichert, 2011).

Aus den gefundenen Ergebnissen wurde ein Modell erstellt, das die Entwicklung, die Organisation und die Struktur der Trakte des Zentralkomplexes in der Abhängigkeit zum Entwicklungszeitpunkt ihrer Axone zeigt (Abbildung 53). Diese Zeitabhängigkeit zeigt sich sowohl bei Neuroblasten des NSC I-Typs als auch des NSC II-Typs.

Auch in anderen Insekten ist die Altersabhängigkeit der Topologie, der Zellkörperpositionen und der axonalen Projektionen in verschiedenen Neuropilen bekannt. Wegerhoff und Breidbach zeigten 1992, dass die Module des Zentralkomplexes von *Tenebrio molitor* nach und nach in den Larvalstadien hinzugefügt werden. Auch Farris und Sinakevitch (2003) zeigten einen Altersgradienten innerhalb der Kenyonzellen der sich entwickelnden Pilzkörper in *Periplaneta americana*. Zellen unterschiedlichen Alters bilden Axonprojektionen in verschiedenen Ebenen der Calyx und der Pedunculi in Richtung der ventralen und medianen Loben. Auch in den Neuroblasten der optischen Anlagen bei Insekten wurde eine

Altersabhängigkeit gefunden (Meinertzhagen, 1973). Die Medulla und die Lobula erhalten ihren modularen Aufbau durch verschiedene Wellen der Zellproduktion, Differenzierung und des Zelltods in diesen Zellgruppen (Panov, 1960; Nordlander und Edwards, 1969). Alle genannten Studien zeigen, dass hoch komplexe Strukturen des Insektengehirns über eine zeitliche Regulation organisiert werden. Die molekulare Komponente der Altersabhängigkeit der Entwicklung komplexer Neuropile muss noch weiter untersucht werden.



Erläuterungen zu Abbildung 53:

Je dunkler die Farbgebung desto älter ist die Zelle.

↑ zeigt nach dorsal.

← zeigt nach anterior.

Abkürzungen in Abbildung 53:

w, x, y, z Trakt w, x, y, z.

CX Zentralkomplex.

1-1, 2-1, 3-1, 4-1 Neuroblasten.

D dorsal.

A anterior.

a, b, c, d Zellpopulationen.

Abbildung 53: Modulare Basis der Traktentwicklung im Zentralkomplex.

Quelle: Williams, Güntner, Boyan (2005).
Arthropod Struct Dev 34, 97-110.

6.2 Entwicklung der Lateralen Zellen und der Pioniere der protocerebralen Kommissur

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Beschreibung der Entwicklung der Lateralen Zellen und Pioniere der protocerebralen Kommissur in der medianen Domäne des embryonalen Gehirns der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*. Diese Zellen sind an der Bildung eines axonalen Gerüsts beteiligt, das als Leitstruktur für die Entwicklung von komplexen Neuropilen dient. Goodman und Doe (1993) und Campos-Ortega und Hartenstein (1997) vermuteten, dass die MD aus dem Mesektoderm entstammt und sich aus ihr Neuronen für das zentrale Nervensystem bilden. Neuronen können sich direkt durch Invagination bzw. Delamination oder über neuronale Vorläuferzellen entwickeln (*Drosophila melanogaster*: Dumstrei et al., 1998).

6.2.1 Neuronale Vorläuferzellen im ventralen Bauchmark (VNC)

Im Bauchmark wird die neuronale Vorläuferzelle „median precursor“ genannt. Sie unterscheidet sich von den Neuroblasten der benachbarten Ganglienhemisphären in mehreren Aspekten:

- Die MP entwickelt sich aus dem Mesektoderm, die Neuroblasten aus dem Neuroektoderm (Goodman und Doe, 1993; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).
- Die MP produziert ihre Abkömmlinge direkt, nicht wie Neuroblasten über Ganglionmutterzellen (*Locusta migratoria*: Bate, 1976; Bate und Grunewald, 1981; Kotrla und Goodman, 1984; Kuwada und Goodman, 1985). In ihrer direkten Entwicklung ähnelt die MP den Teloblasten der Crustaceen (Anderson, 1973).
- Auch auf der molekularen Ebene gibt es Unterschiede zwischen der medianen Vorläuferzelle und den Neuroblasten. NBs exprimieren im Gegensatz zur medianen Vorläuferzelle das Engrailed-Protein (Patel et al., 1989). Die Expression des Proteins Engrailed zeigt posteriore Kompartimentgrenzen an. Die MP befindet sich jedoch in den anterioren Bereichen des jeweiligen Segments. Das könnte das Fehlen der Engrailed-Expression erklären. Das Gen *wingless* wird in der Anlage des Protocerebrums exprimiert (*Drosophila melanogaster*: Richter et al., 1998). Durch eine Repression durch Wingless und Aktivierung durch Hedgehog wird in *Drosophila melanogaster* das proneurale Gen *lethal of scute* in Nachkommen der Mittellinienneuroblasten aktiviert. Diese werden dadurch Engrailed-positiv. Engrailed-positive Zellen entwickeln sich zu ventralen unpaaren medianen Neuronen (VUM), Engrailed-negative Zellen zu unpaaren medianen Interneuronen (UMI), MP1-Interneuronen und Glia (Bossing und Brand, 2006). Damit determiniert dieser genetische Signalweg das Entwicklungsschicksal der Zellen.

Für diese Arbeit sind Untersuchungsergebnisse relevant, die zeigen, dass die Nachkommen der medianen Vorläuferzelle in der Embryonalentwicklung Mes-3 exprimieren (Kotrla und Goodman, 1984; Kuwada und Goodman, 1985). Mes-3 zeigt den mesektodermalen Ursprung von Zellen an und wird sowohl von neuronalen als auch von nicht neuronalen Zellen wie Muskelpionieren exprimiert (Kotrla und Goodman, 1984). Die mediane Vorläuferzelle ist damit mesektodermalen Ursprungs.

6.2.2 Die mediane Domäne und ihre neuronalen Vorläuferzellen

Im Embryonalgehirn von *Drosophila* und *Schistocerca* bildet die mediane Domäne einen streifenförmigen Zellverband, der aus dem ventralen Epithel zur Basalmembran zieht und von den protocerebralen Hemisphären begrenzt wird (Dumstrei et al., 1998; Ludwig et al., 1999). In Mutanten von *Drosophila melanogaster*, in welchen die Funktion des EGFR-Signalwegs inhibiert ist, entwickeln sich die optischen Loben, das stomatogastrische Nervensystem und das dorsomediale Gehirn nur teilweise oder gar nicht (Dumstrei et al., 1998). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich die Nachkommen der medianen Vorläuferzelle in lateraler Richtung im Gehirn ausbreiten und das Mesektoderm nicht nur an der Bildung der medianen Ocelli sondern auch an der Bildung der lateralen Ocelli beteiligt ist. Auch die Neuralleiste von Säugetieren ist mesektodermalen Ursprungs und damit unter anderem auch folgende Zelltypen, die diese hervorbringt (Sanes et al., 2011):

- sympathisches Ganglion
- dorsales Wurzelganglion
- Nebennierenmark
- Schwann'sche Zellen des peripheren Nervensystems
- glatte Muskulatur

Die mediane Domäne wurde auf molekularer Ebene beschrieben und es wurde die Expression von EGFR gefunden. *egfr* wird für die Differenzierung und die Erhaltung der Vorläuferzellen innerhalb der medianen Domäne benötigt (Dumstrei et al., 1998). Diese EGFR-exprimierenden Zellen werden „Kopfmittelzellen“ („head midline cells“) genannt. Auch wenn sich die entwickelnde Zelllinie noch nicht voll ausgebildet hat, wird von diesen Zellen der Gehirnmittellinie über mehrere Stunden das proneurale Gen *lethal of scute/single-minded* (*l'sc*) exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimieren Neuroblasten *l'sc* nur über kurze Zeiträume (Dumstrei et al., 1998). Die Art der Organisation der mesektodermalen Zellen ist essentiell für die richtige Ausbildung des Axongerüsts des zentralen Nervensystems. Die Abwesenheit des Proteins des *single-minded* (*sim*) Gens, einem Transkriptionsfaktor im Embryo von *Drosophila*, führt zu einer Lücke in den längsgerichteten Gliazellen zwischen Gehirn und Bauchmark. Die Lücke kann durch longitudinale Pionieraxone nicht überbrückt werden. Als Konsequenz werden keine circumoesophagealen Konnektive ausgebildet. (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988; Nambu et al., 1990, 1991; Sonnenfeld und Jacobs, 1994). *sim* gilt als Schlüsselentwicklungsfaktor („Masterregulator“) von Zellen in der ZNS-Mittellinie (Nambu et al., 1991).

6.2.3 Pioniere der medianen Domäne von *Scg*

In *Schistocerca gregaria* wurden zwei Untereinheiten der medianen Domäne gefunden, die in ihren unterschiedlich orientierten mitotischen Achsen differieren und spezifische Strukturen im adulten Gehirn ausbilden (Ludwig et al., 1999). Der mediane Ocellus entsteht aus der ventralen Untereinheit (Mobbs, 1976; Goodman, 1981). Die dorsale Untereinheit bildet die Lateralen Zellen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, sowie einen Zellhaufen, der nach posterior wandert (Abbildung 34 D, E) und sich zum frontalen Ganglion des stomatogastrischen Nervensystems entwickelt (Ganfornina et al., 1996). *Schistocerca* und *Drosophila* zeigen in diesem Fall eine ähnliche Entwicklung. In der dorsalen medianen Domäne differenziert die mediane Vorläuferzelle (Ludwig et al., 1999). Diese Zelle zeigt keine Engrailed-Expression (Boyan et al., 1995b; Boyan und Williams, 2002) und bildet sechs Nachkommen (Ludwig et al., 1999). Die Nachkommen entwickeln sich zu absteigenden Interneuronen. Die Axone dieser Interneuronen projizieren zusammen mit denen der PCPs in das Bauchmark (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002).

Ebenso wurden die bilateral symmetrisch gepaarten Pioniere der protocerebralen Kommissur und die unpaaren Lateralen Zellen, zwei Zelltypen, die sich nicht aus Vorläuferzellen, sondern direkt aus dem Mesektoderm entwickeln, identifiziert. Manche Pioniere bzw. neuronale Vorläuferzellen werden unpaar angelegt wie zum Beispiel die Lateralen Zellen, andere paarig, wie die primären und sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur. Für die Anlage von paarigen oder unpaarigen Pionieren und neuronalen Vorläuferzellen können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein:

- Neuronen können sich direkt entwickeln oder indirekt über neuronale Vorläuferzellen (*Drosophila melanogaster*: Dumstrei et al., 1998).
- Es besteht eine Abhängigkeit von der mitotischen Teilungsrichtung: Erfolgt die Teilung und die Differenzierung der Pioniere parallel zur ektodermalen Oberfläche, wie bei der Invagination, entsteht ein unpaares Neuron. Erfolgt die Entwicklung senkrecht, können paarige Pioniere wie in der Antenne von *Schistocerca gregaria* entstehen (Boyan und Williams, 2004, 2007).
- Ein zusätzlicher Mechanismus zur Bildung von unpaaren Pionieren ist die Lateralinhibition. Bei *Drosophila* werden beispielsweise durch die Proteine Notch-1 und Numb im ventralen Bauchmark benachbarte Zellen von Neuroblasten daran gehindert, selbst zu neuronalen Vorläufern zu differenzieren (Skeath und Thor, 2003).
- Unpaare Pioniere können auch durch das Absterben einer der beiden Schwesterzellen entstehen (White et al., 1976; Horvitz et al., 1982; Kumar et al., 2009).

Ausschließlich die PCPs exprimieren Term-1 im embryonalen Nervensystem (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999). Die PCPs entwickeln den primären Faszikel der zwischen den Hemisphären laufenden primären Kommissur (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999, 2001). Außerdem entwickeln sich die PCPs zu absteigenden Neuronen des zentralen Nervensystems (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999, 2002). Sie exprimieren ein Leukokinin-1-ähnliches Neuropeptid in der larvalen Entwicklung (Ludwig et al., 2001). Mitglieder der Familie der leukokininähnlichen Peptide modulieren das ZNS, induzieren Kontraktionen der viszeralen Muskulatur und stimulieren die Sekretion der Malpighischen Gefäße (Reviews: Holman et al., 1986; Torfs et al. 2000). Die Zellen können durch diese Expression und durch den mesektodermalen Ursprung als neurosekretorische Zellen mit neurotropher Funktion identifiziert werden (Ludwig et al., 2001).

Die Lateralen Zellen entwickeln sich unpaar an beiden Grenzen der medianen Domäne, nahe den protocerebralen Hemisphären (Abbildung 33B). Durch intrazelluläre Färbemethoden (Boyan et al., 1995a) und die Expression des GPI-gebundenen Oberflächenlipocalins Lazarillo (Ganforina et al., 1995; Sánchez et al., 1995; Graf et al., 2000) wurden die LCs identifiziert und charakterisiert. Lipocaline sind Proteine mit einer konservierten Struktur aus acht Untereinheiten und einem ligandbindenden Fach. Lipocaline haben verschiedene Funktionen, wie z.B. die Regulation der Lebensdauer, des Stresslevels und des Lipidmetabolismus von Insekten (Ruiz et al., 2013) und beeinflussen die Axonlenkung (Sánchez et al., 1995) in der neuronalen Entwicklung. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass die LCs direkt aus dem Mesektoderm in der medianen Domäne delaminieren. BrdU-Einlagerungen zeigen bis 50% der Embryonalentwicklung nur eine einzige Vorläuferzelle, die ausdifferenziert (Ludwig et al., 1999). Intrazelluläre Färbemethoden zeigen eine Verbindung der medianen Vorläuferzelle ausschließlich mit den eigenen Nachkommen, die sich direkt aus der MP ohne GMC entwickeln (Ludwig et al., 1999), und keine Verbindung mit den Lateralen Zellen. Weitere iontophoretische Markierungen der LCs mit DiI und LuY zeigen stark gefärbte Neurite, Axone und Wachstumskegel, aber keine Farbstoffkoppelungen mit der medianen Domäne und den protocerebralen Hemisphären (Abbildung 36). Die mediane Vorläuferzelle zeigt eine klare Verbindung mit ihren Nachkommen (Ludwig et al., 1999). Die fehlende Farbstoffkoppelung bei den Lateralen Zellen zeigt, dass diese keine Vorläuferzellen haben, sondern direkt aus dem Mesektoderm delaminieren. Dabei differenzieren einzelne mesektodermale Zellen direkt zu den LCs.

Immunzytochemische Daten zeigen die HRP-Expression der Lateralen Zellen (Abbildung 34). Damit sind sie Neuronen (Jan und Jan, 1982; Snow et al., 1987; Ludwig et al., 1999; Graf

et al., 2000). Wie bei den primären Pionieren der protocerebralen Kommissur und den Nachkommen der medianen Vorläuferzelle zeigt sich eine Koexpression von HRP und Mes-3 (Abbildung 37). Die Zellen der medianen Domäne im Gehirn und die Nachkommen der medianen Vorläuferzelle im Bauchmark gleichen sich damit in ihrer Entwicklung (Kotrla und Goodman, 1984; Kuwada und Goodman, 1985). Diese Erkenntnisse bestätigen die Hypothese: Die Lateralen Zellen und die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur stammen aus dem mesektodermalen Keimblatt des Embryos.

Ein weiteres Ergebnis zeigt die Mes-3-exprimierenden Axone der Lateralen Zellen, die in das primäre Faszikel der primären Kommissur des Gehirns projizieren (Abbildung 34). Um einige dieser Axone zu identifizieren, wurden iontophoretische Färbemethoden verwendet. Anschließend wurden die Präparate mit Hilfe von Fotokonversion und einem Elektronenmikroskop ausgewertet (Abbildung 35). Es wurde gezeigt: Die Lateralen Zellen faszikulieren mit den Mes-3 und Term-1 koexprimierenden Pionieren des primären Faszikels der sich entwickelnden primären Kommissur.

6.2.4 Bildung der primären protocerebralen Kommissur

Die PCPs bilden die erste Verbindung zwischen den beiden Gehirnhemisphären (Abbildung 54A). Die Lateralen Zellen wachsen zunächst Richtung primäre Pioniere der protocerebralen Kommissur und dann Richtung der sekundären Pioniere der protocerebralen Kommissur (Abbildung 54B). Die SCNs faszikulieren mit den LCs und zusammen mit den PCPs bündeln sie sich zur protocerebralen Kommissur (Abbildung 54C). Diese Entwicklung wurde von Boyan et al. 2003 beschrieben. Sie ist in Abbildung 54 schematisch dargestellt.

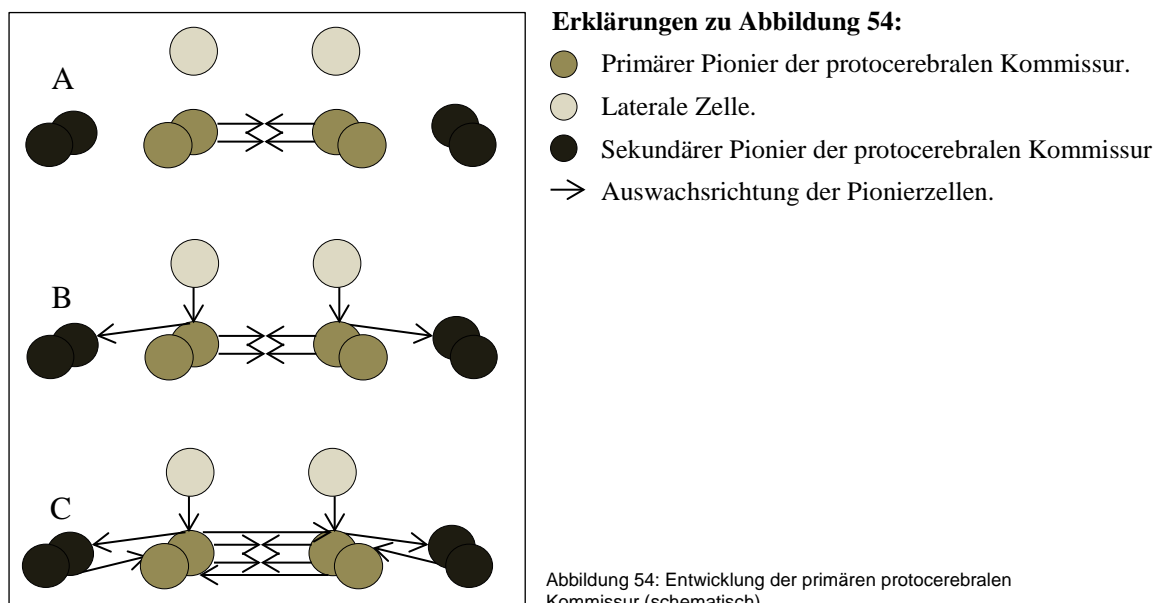


Abbildung 54: Entwicklung der primären protocerebralen Kommissur (schematisch).

Durch die Faszikulierung der identifizierten Zellen zur primären Kommissur bildet sich eine Leitstruktur, an der sich Neuropile bei ihrer Ausdifferenzierung orientieren. Zusätzlich zum anterioren ist auch das posteriore Kommissurensystem an diesem Axongerüst beteiligt. Auch der Zentralkomplex orientiert sich an dieser Struktur. Der Zentralkörper und die protocerebrale Brücke sind durch Trakte verbunden. Sie zeigen bis zur mittleren Embryonalentwicklung eine orthogonale Morphologie. Nach 55% der Embryogenese entstehen charakteristische Chiasmen, die sich zwischen dem anterioren und posterioren Kommissurensystem entwickeln. Axone der Trakte verlassen während dem „fascicle switching“ (Faszikelwechsel) das anteriore Kommissurensystem und faszikulieren, wie in Abbildung 55 dargestellt, mit der posterior gelegenen Kommissur (Boyan et al., 2008b). Die typische kolumnare Morphologie des Zentralkörpers, die dem adulten Aussehen entspricht, ist ab 80% der Embryonalentwicklung (Abbildung 4) vollständig erkennbar (Williams et al., 2005).

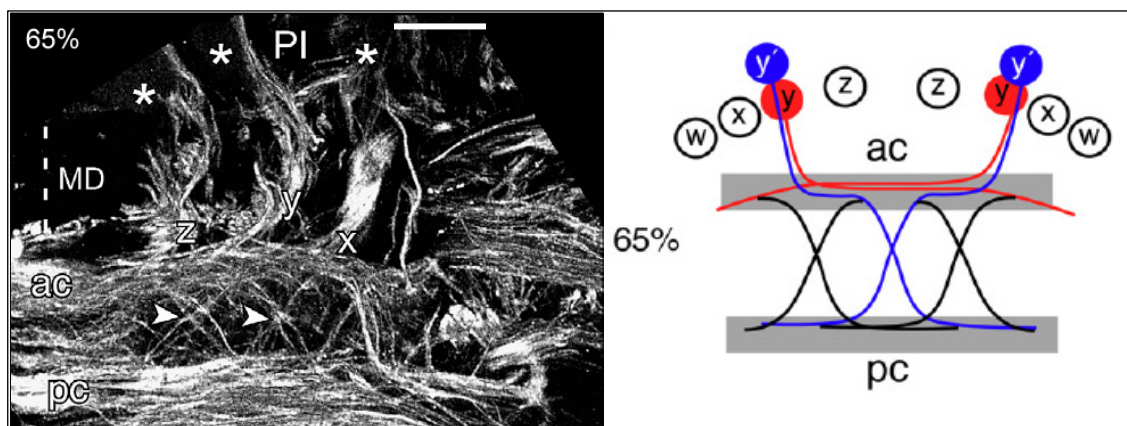


Abbildung 55: Chiasmabildung des Zentralkomplexes durch Faszikelwechsel in *Schistocerca gregaria* bei 65% der Embryonalentwicklung. 8B7-Immunzytochemie.
Maßstab Bild A: 25µm.
Quelle: Boyan, Williams, Herbert (2008b). *Arthropod Struct Dev* 37, 539-544.

Erläuterungen zu Abbildung 55:

Bild A: Färbung gegen 8B7

bei 65% der Embryonalentwicklung.



* Zellkörper in der Pars intercerebralis.



: Mittellinie.



► Chiasmen.

Bild B: Schema der Chiasmabildung bei 65% der Embryonalentwicklung.

Abkürzungen Abbildung 55:

Bild A: PI Pars intercerebralis.

MD Mediane Domäne.

ac anteriores Kommissurensystem.

pc posteriores Kommissurensystem.

x, y, z Trakte x, y, z.

Bild B: ac anteriores Kommissurensystem.

pc posteriores Kommissurensystem.

W, X, Z Zellgruppen.

y, y' Axone der Zellgruppe Y.

Das Prinzip des Faszikelwechsels wurde auch in der frühen Embryogenese von Arthropoden wie Cheliceraten und Diplopoden beobachtet (vgl. Strausfeld, 2012). Cheliceraten bilden z.B. einen bogenförmigen Körper „arcuate body“ aus (Homberg, 2008), der die gleichen

Funktionen wie der Zentralkomplex der Insekten erfüllt. Das deutet darauf hin, dass dieses Prinzip ein allgemeines Entwicklungsprogramm im Reich der Arthropoden darstellt.

6.2.5 Wanderungen der Pionierzellen

Die Lateralen Zellen, die primären Pioniere der protocerebralen Kommissur und die mediane Domäne delaminieren aus dem mesektodermalen Epithelium, jedoch ist der genaue Entstehungsort dieser Zellen nicht bekannt. Sie könnten an ihrer charakteristischen Endposition entstehen (Abbildung 33) oder von anderen Ursprüngen dorthin einwandern. Die histologischen Daten einschließlich der BrdU-Einlagerung in der Embryokultur zeigen, dass die Delamination im anterior-ventralen Mesektoderm erfolgt und anschließend eine posteriore Wanderung zum Ort der endgültigen Zelldifferenzierung in der medianen Domäne stattfindet. Die Neuronen wandern entlang zellulärer Prozesse. Ähnliche Zellwanderungen wurden bereits bei anderen Insekten beschrieben (Locke und Huie, 1981). Wanderungen vor der endgültigen Zelldifferenzierung konnten auch in anderen Bereichen des sich entwickelnden Insektennervensystems beobachtet werden (Abbildung 18), so z.B. in einer Gruppe von mesektodermalen Zellen, die in posteriorer Richtung von der medianen Domäne weg wandern, um das frontale Ganglion des stomatogastrischen Nervensystems der Heuschrecke zu bilden (Ganformina et al., 1996). Auch im Nervensystem von *Manduca sexta* wurde diese Zellwanderung nachgewiesen (Copenhaver und Taghert, 1989). Zellwanderungen können in tangentialer und radialer Richtung erfolgen. Unter anderen sind folgende Mechanismen der Zielorientierung von Zellen bekannt:

- Orientierung an Wegweiserzellen, die den wandernden Zellen die Richtung anzeigen (Bentley und Caudy, 1983; Bastiani et al., 1985)
- Molekulare Gradienten wie z.B. die Ca^{2+} -Konzentration (Bentley et al., 1991)
- Faszikulierung mit bereits vorhandenen Axonen (Bauchmark *Scg*: Bastiani und Goodman, 1986)
- Orientierung und Anheftung am Epithelium (Jessel, 1988). Die Anheftung erfolgt z.B. am Adhäsionsmolekül N-Cadherin, das von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist (Tomaselli et al., 1988) oder an den Molekülen Fasciclin I und II (Bastiani et al., 1987; Boyan et al., 1995a).

6.2.6 Weitere Entwicklung der Pionierneuronen

Verschiedene Pioniere sterben im Laufe der Entwicklung ab, z.B. bei der Heuschrecke in der Mitte der Embryogenese (Antennenbasis: Berlot und Goodman, 1984; Bein: Kutsch und Bentley, 1987). Andere Pioniere wandeln sich in Neuronen um, z.B. der Pionier des Neuroblasten 7-4 des Bauchmarks (Pearson et al., 1985; Myers und Bastiani, 1993a, b). Wieder andere Pioniere wie die PCPs entwickeln sich zu neurosekretorischen Zellen (Boyan et al., 2003, 2004).

6.2.7 Weiterführende Experimente

Weiterführende Experimente müssen den Ursprung der medianen Domäne im Heuschreckengehirn zeigen, um die Ontogenie der entstehenden Zellen detaillierter beschreiben zu können. Da die iontophoretischen Markierungen von LCs und PCPs keine Farbstoffkoppelungen zu möglichen Vorfahren und Nachkommen zeigen (Abbildung 36), könnten Farbstoffinjektionen in mesektodermale Gewebe die Nachkommen und Entwicklungen von bestimmten Zellen und Zelllinien aufzeigen, wie z.B. von postmitotischen Zellen und epithelialen Zellen. Alternativ könnte eine kombinierte Lektin- und Goldprobe in Erwägung gezogen werden. Diese Methode wird in Säugetierembryokulturen verwendet, da die Lektin/Gold-Kombination membrangebundene Vesikel der mesektodermalen Vorläuferzellen färbt und damit als mesektodermaler Marker dient (Smits van Prooije et al., 1996). Optimal wäre, einen heuschreckenspezifischen Marker zu finden, wie das *single-minded*-Gen von *Drosophila*, das die Entwicklung von mesektodermale Zelllinien in der Mittellinie des zentralen Nervensystems steuert (Sonnenfeld und Jacobs, 1994) oder ein Gen, das dem Säugetiergen GAP-43 ähnelt und in einem metameren Muster im Mesektoderm und der sich entwickelnden Epidermis exprimiert wird (Ng et al., 1989). Die Expression dieses Proteins ist auf wenige Zellgruppen beschränkt, die ein segmentales Muster bilden und vermutlich zum Gerüst des longitudinalen Neuropils beitragen.

Verschiedene Neuromodulatoren, Hormone und Botenstoffe sind für eine adäquate Entwicklung des ZNS notwendig. Die Expressionsmuster bzw. die zeitlichen Vorkommen einiger dieser Moleküle werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

6.3 Neuromodulatorexpression im Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria*

In diesem Teil der Arbeit werden die räumlichen Expressionsmuster von verschiedenen Peptidfamilien und Botenstoffen im embryonalen, larvalen und adulten Zentralkomplex der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* betrachtet.

6.3.1 Räumliche Expressionsmuster von Peptiden in Abhängigkeit des Entwicklungszeitpunktes

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass im embryonalen Gehirn von *Schistocerca gregaria* unter anderen Peptiden von folgenden Familien exprimiert werden: Tachykinin, Allatostatin, FLRFamid, Periviscerokinin und Pyrokinin. Ebenso kann die Expression des Monoamins Serotonin und das Vorhandensein des gasförmigen Botenstoffes NO gezeigt werden. Die Expression dieser Peptide und die Präsenz von NO lassen sich in einem spezifischen, festgelegten zeitlichen Muster im Zentralkomplex des Heuschreckenembryos erkennen. Durch MALDI-IMS konnten einzelne Peptide zum ersten Mal spezifischen Regionen im Insektengehirn zugeordnet werden (Abbildung 39, Abbildung 40, Tabelle 6). Ohne diese Technik war die präzise Identifikation der Tachykinine nicht möglich, da für diese immunzytochemische Methode nur unspezifische Antikörper für die genannten Peptidfamilien zur Verfügung standen. Beide Methoden kombiniert zeigen ein charakteristisches biochemisches Muster des Zentralkomplexes zu den untersuchten Entwicklungszeitpunkten von *Schistocerca gregaria*. Werden die biochemischen Ergebnisse mit der Neuroarchitektur des Zentralkomplexes in Beziehung gebracht, verbessert sich das Verständnis für dessen funktionelle Aufgaben.

Es können einige grundlegende Expressionsmuster und zeitliche Vorkommen von Neuromodulatoren und Botenstoffen im Laufe der Entwicklung des Zentralkomplexes gezeigt werden. Die Muster sind in Abbildung 56 schematisch dargestellt. In diesem Schema ist zur Vereinfachung und Vergleichbarkeit bereits bei 50 bzw. 60% der Embryogenese der endgültige Aufbau des Zentralkomplexes dargestellt.

Die Expressionen verschiedener Neuromodulatoren beginnen zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung des Zentralkomplexes. So manifestieren die Noduli und die Trakte erst postembryonal eine Immunreaktivität von Serotonin. Andere Neuromodulatoren wie *LomTK*, *AST* und *NO* werden dagegen schon im Embryo exprimiert bzw. hergestellt. Die

Intensitätssteigerung der Antikörperfärbungen im Laufe der Embryonalentwicklung erfolgt stufenweise. Damit ist festzustellen: Die Expression der Peptide erfolgt nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, womit gezeigt wird, dass die Genexpression sukzessive zunimmt. Diese Ergebnisse können nicht ausschließlich durch die Vergrößerung der Verzweigungen der Axone erklärt werden, sondern begründen sich zusätzlich durch eine Zunahme der immunreaktiven Zellen in den betreffenden Zentralkomplexmodulen. Folgende Schlüsse sind daraus zu ziehen:

- Der Zentralkomplex von hemimetabolen Insekten wie der, der Wüstenheuschrecke ist damit beim Schlüpfen des Embryos anatomisch weitgehend entwickelt. Zacharias et al. (1993) zeigten, dass drei nicht identifizierte Neuroblasten bereits bei 70% der Embryonalentwicklung degenerieren. Markierungsversuche durch Apoptosemarker zeigen nach 77% der Embryogenese, dass die Neuroblasten in den programmierten Zelltod gehen (Boyan und Liu, 2014). In den Pilzkörpern sind die Neuroblasten dagegen auch nach 80% der Embryonalentwicklung mitotisch aktiv. In Grillen wurde auch in adulten Tieren mitotische Aktivität festgestellt (Cayre et al., 1994, 1996, 2007), hingegen werden im Zentralkomplex der Heuschrecke, die mitotischen Zellzyklen bereits embryonal beendet. Der morphologische Aufbau des Zentralkomplexes von *Schistocerca gregaria* wird somit bereits in der Embryogenese abgeschlossen, nicht jedoch die biochemischen Ausstattung dieses Neuropils. Die biochemische Entwicklung kann über 40% der Embryogenese (Boyan et al., 2010a), über die Larvalstadien bis hin zum adulten Tier andauern. Die stufenweise Zunahme der Immunreaktivität ist nicht durch eine Zunahme der absoluten Zellzahl zu erklären, sondern durch eine zunehmende Anzahl der Zellen, die immunreaktiv werden.
- Die lateralen akzessorischen Loben und der Zentralkörper sind bereits bei 50% der Embryogenese immunreaktiv, die protocerebrale Brücke und die *w*-, *x*-, *y*- und *z*-Trakte bei 80% der Embryonalentwicklung. Wird ein Neuromodulator sowohl im tangentialen als auch im kolumnaren System des Zentralkomplexes exprimiert, sind die tangentialen Neuronen früher immunreaktiv als die kolumnaren. Ursache für die differente Expression könnte der Ursprung der tangentialen und kolumnaren Fasern in verschiedenen Gehirnbereichen und die unterschiedlichen Funktionen dieser Zentralkomplexneuronen sein. Die kolumnaren Neuronen stammen aus der Pars intercerebralis (Vitzthum et al., 1996; Vitzthum und Homberg, 1998; Homberg, 2002). Einige dieser Neuronen

stehen über das Bauchmark in Verbindung zu thorakalen motorischen Zentren, andere zum retrocerebralen Komplex über die Neuronen der Corpora cardiaca (Burrows, 1996). Die tangentialen Neuronen verbinden die akzessorischen Loben mit den anterioren optischen Tuberkeln und dem Bauchmark. Das tangentielle System erfüllt Funktionen in der Verarbeitung von polarisiertem Licht, in der visuellen Mustererkennung und bei der räumlichen Orientierung (Träger et al., 2008). Die Informationen könnten über die tangentialen Neuronen den Zentralkomplex erreichen und über das kolumnare System die prämotorischen Prozesse steuern. Ausgehend von diesen Funktionen werden im tangentialen Bereich des Zentralkomplexes die Neuromodulatoren früher benötigt als im kolumnaren Anteil.

- Einige Neuropeptide wie *LomTK* und AST werden schon vor klassischen Transmittern wie Serotonin oder gasförmigen Botenstoffen wie NO exprimiert, wie in Abbildung 56 nachvollziehbar aufgezeigt wird. Auch im kolumnaren System besteht eine ähnliche Reihenfolge der Expressionen (*LomTK* vor NO vor AST zwischen 70 und 80% der Entwicklung). Die Serotonin-Immunreaktivität in den Säulen entsteht erst postembryonal. Diese Feststellungen könnten Rückschlüsse auf die Funktionen der genannten Neuromodulatoren und Botenstoffe zulassen. Dazu sind jedoch weiterführende Studien nötig.

Innerhalb der Y- und Z-Zelllinie wurden von Boyan et al. (2010a) die Expressionsmuster von vier Neuromodulatoren in der embryonalen Entwicklung beschrieben:

- Locustatachykinin
- Leukokinin-1
- Allatostatin
- Serotonin.

In den ältesten Zellen der Entwicklungslinien werden *LomTK* und Leukokinin exprimiert, in der Mitte der Entwicklungslinie AST und in den jüngsten Zellen der Zelllinie Serotonin (Boyan et al., 2010a). Die unterschiedlichen Entwicklungen der Expressionsmuster in Abhängigkeit der Geburtszeitpunkte einzelner Zellen spiegeln sich in der zeitlichen Entwicklung der biochemischen Neuroarchitektur wider (siehe Abbildung 56). Zur embryonalen Entwicklung von Zelllinien sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Neuromodulatoren, Hormone und Botenstoffe notwendig, um eine adäquate Entwicklung zu gewährleisten.

6.3.2 Funktionelle Aspekte der Neuromodulatorexpression

Sich entwickelnde neuronale Netzwerke zeigen bereits eine biochemische Aktivität, bevor sie ihre charakteristischen Funktionen wahrnehmen. Dieses gilt sowohl für Invertebraten (Stevenson und Kutsch, 1986) als auch für Vertebraten (Feller, 1999; Moody und Bosma, 2005). Funktionelle Muster sind schwer zu interpretieren, da Neuromodulatoren im Embryo andere physiologische Wirkmechanismen haben können als im adulten Tier und ihre spezifischen Rezeptoren schon vor den jeweiligen Neuromodulatoren vorhanden sein können (Rehm et al., 2008).

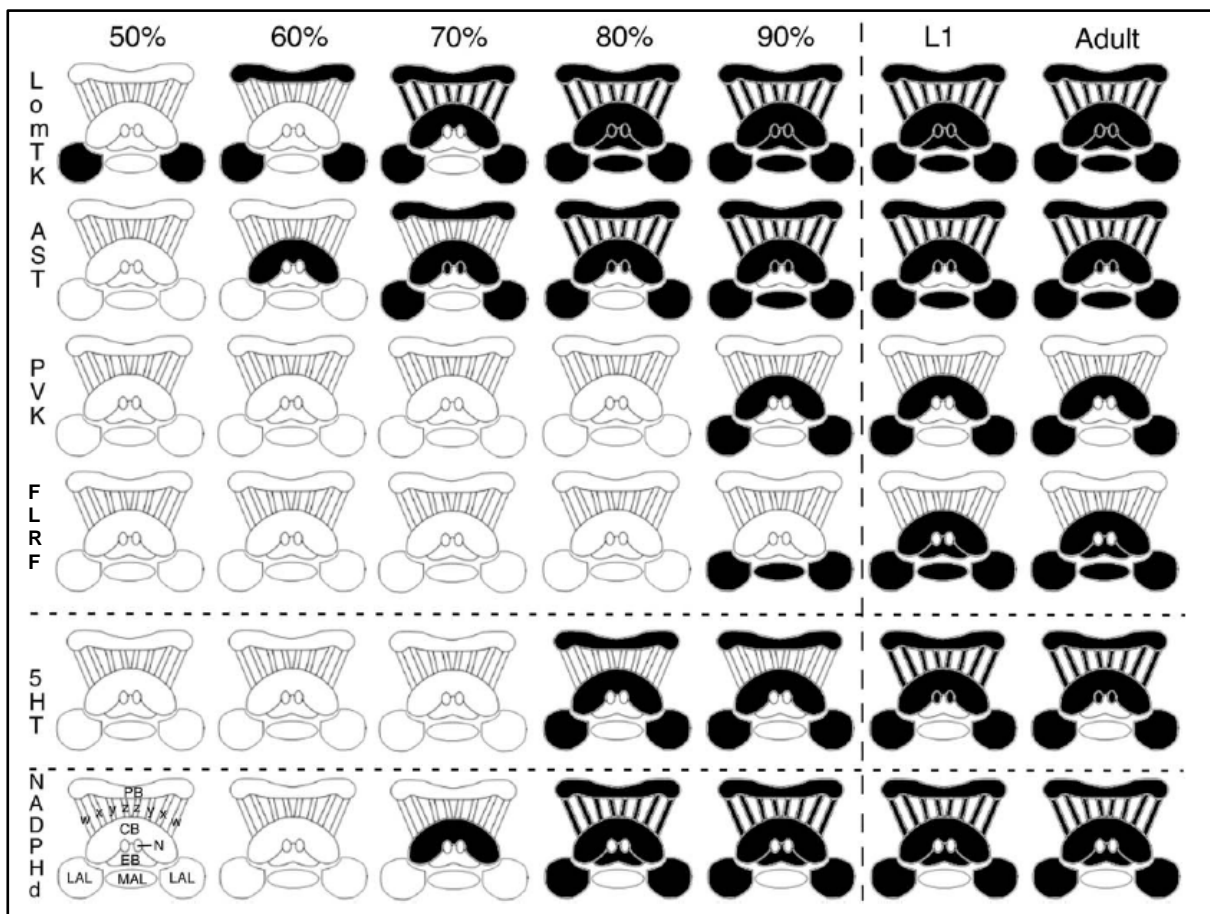


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener Neuromodulatoren.
Quelle: Herbert, Rauser, Williams, Kapan, Güntner, Walch, Boyan (2010). J Morphol 271, 1509-1526. verändert.

Erklärungen zu Abbildung 56:

Schematische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener Neuromodulatoren in den verschiedenen Teilen des Zentralkomplexes während der embryonalen und postembryonalen Entwicklung.
Zeitpunkt des Schlüpfens.

--- Trennungslinien zwischen Peptiden,

Neurotransmitter, gasförmigem Botenstoff.

Zu beachten ist, dass zur Vereinfachung und Vergleichbarkeit bereits bei 50% der Embryogenese die endgültige Morphologie des Zentralkomplexes gezeigt wird.

Abkürzungen in Abbildung 56:

LomTK *Locusta migratoria*-Tachykinin.

AST Allatostatin. PVK Periviscerokin.

FLRF Phenylalanin-Leucin-Arginin-Phenylalanin.

5HT NADPHd. PB protocerebrale Brücke.

CB Zentralkörper. N Noduli.

EB ellipsoider Körper.

LAL lateraler akzessorischer Lobus.

MAL medianer akzessorischer Lobus.

L1 Larvalstadium.

w, x, y, z Trakte w, x, y, z.

6.3.3 Die Neuromodulatoren im Einzelnen

Im Folgenden werden die Expressionsmuster der untersuchten Neuromodulatoren *LomTK*, AST, PVK/PK und FLRFamid, Serotonin und das Verteilungsmuster des endogenen Botenstoffes NO im Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria* im Einzelnen diskutiert. Zudem wird näher auf die Funktionen der genannten Moleküle und Proteine auch außerhalb des Zentralkomplexes der embryonalen und adulten Heuschrecke eingegangen.

6.3.3.1 Tachykinin

In früheren Studien war die Identifikation der Tachykinine in spezifischen Gehirnregionen mangels geeigneter Massenspektrometrie-Technik nicht möglich (Eckert et al., 2002; Predel et al., 2003; Neupert et al., 2007, 2009; Neupert und Predel, 2010). Im Jahr 2002 wurden die ersten Antiseren gegen einige Isoformen der Tachykinine in der Schabe hergestellt (Nässel und Winther, 2002). Die MALDI-IMS Technik erlaubt mittlerweile eine schnelle, einfache, reproduzierbare Möglichkeit, einzelne Peptide in Geweben in einer Auflösung von 50µm zu identifizieren und damit detaillierte Expressionsmuster zu erstellen (Abbildung 39, Abbildung 40). Mit diesem Verfahren konnte gezeigt werden, dass im adulten Zentralkomplex sowohl *LomTK I* als auch *LomTK II* exprimiert werden (Schoofs et al., 1997). Die Expression von *LomTK* beginnt bei 70% der Embryonalentwicklung (Abbildung 41) im sich gerade entwickelnden kolumnaren System des Zentralkomplexes (Boyan et al., 2008a, b).

Tachykinine wirken hormonell, modulatorisch und als Transmitter. Ihre Auswirkungen im Organismus sind vielfältig. Diese Diversität hängt von den unterschiedlichen Typen der Tachykinin-Rezeptoren ab (Severini et al., 2002). In verschiedenen embryonalen Nervensystemen werden Tachykinine schon früh in der Entwicklung exprimiert (*Spodoptera litura*: Kim et al., 1998; Cricetinae: Antle et al., 2005). Peptide der Tachykininfamilie können zusätzlich als neurotrophe Faktoren wirken (Satake et al., 2003; Catalani et al., 2006), zum Beispiel in sich entwickelnden respiratorischen Netzwerken (Wong-Riley und Liu, 2005).

6.3.3.2 Allatostatin

Im Zentralkomplex der Heuschrecke werden drei Mitglieder der AST-Familie, *Scg-Allatostatin-1*, -4 und -10 exprimiert (Abbildung 42). Diese Peptide, Schistostatine, wurden bereits identifiziert (Schoofs et al., 1998).

Allatostatine werden eine Rolle in der Zentralkomplexentwicklung zugeschrieben. Sie sind pleiotrop. Als Neurohormon inhibieren die Allatostatine die Synthese des juvenilen Hormons über die Corpora allata. Das juvenile Hormon ist für die Steuerung der larvalen Häutungen von Insekten und Crustaceen notwendig (Stay und Tobe, 2007). Ebenfalls als Inhibitor wirken Allatostatine als Modulator der Muskelkontraktion. Auch in der Entwicklung von neuronalen Netzwerken wirken AST inhibierend (Rankin et al., 1998; Dircksen et al., 1999; Kreissl et al., 1999).

In weiteren Studien könnten Funktionen in der Ausbildung von synaptischen Wegen, die an der Lokomotion und Lautbildung teilhaben, festgestellt werden. Weiterer Forschungsbedarf besteht zur Rolle der Allatostatine in der Zentralkomplexentwicklung.

6.3.3.3 Periviscerokinin und Pyrokinin (Lom-PVK 1, Lom-PVK 2, Scg-PVK-3, Scg-PK1-7)

Die Massenspektrometrie zeigt in dieser Arbeit, sowohl die Pyrokinine *Scg*-PK-1 und -3, als auch die Periviscerokinine *Lom*PVK-1, *Lom*PVK-2, *Scg*-PVK-3, die im Zentralkomplex der Heuschrecke exprimiert werden. Eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung zeigt erst bei 90% der Embryonalentwicklung PVK/PK-Peptide in den tangentialen Projektionen des Zentralkomplexes, nicht jedoch in den kolumnaren Fasern. Das Expressionsmuster dieser Peptide ähnelt dem des dritten Larvalstadiums (Abbildung 43), was darauf hindeutet, dass PVK/PK zum Schlüpfen des Embryos bzw. zum Häuten der Larven benötigt wird.

Eine massenspektrometrische Untersuchung der neurohämalen Organe und des zentralen Nervensystems hat Mitglieder der Periviscerokinin-Familie, das *Lom*-PVK 1, *Lom*-PVK 2 und *Scg*-PVK-3 sowie der Pyrokinin-Familie, *Scg*-PK 1 bis 7 bei *Schistocerca gregaria* gezeigt (Clynen et al., 2003a, b). Es wurden jedoch keine einzelnen periviscerokinin- oder pyrokininpositive Neuronen in der Heuschrecke beschrieben.

Periviscerokinine sind neuroaktiven Moleküle. Sie wurden bei bereits untersuchten Insekten in neurosekretorischen Organen und in den Interneuronen des zentralen Nervensystems gefunden. So gibt es zum Beispiel positive Neuronen in den kolumnaren Fasern im ventralen Nervensystem von *Periplaneta americana* (Eckert et al., 1999). Es sind keine Funktionen der PVKs in der Neurogenesis oder der Ausdifferenzierung von Neuronen bekannt. Die Kenntnis von myomodulatorischen und diuretischen Funktionen führt zu der Hypothese: Die

Expression der PVKs in der postembryonalen Phase ist relevant für den Übergang von der embryonalen zur adulten Ernährung (Predel und Wegener, 2006).

6.3.3.4 FLRFamid

Im Zentralkomplex sind die tangentialen Projektionen FLRFamid-positiv. Die Immunreaktivität erscheint erst bei 80% in der Embryonalentwicklung (Abbildung 44). Das vollständige Expressionsmuster zeigt sich erst in den Larvalstadien. *Scg*-FLRF wurde von Robb et al. (1989) im Gehirn von *Schistocerca gregaria* gefunden und beschrieben. Mit der MALDI-IMS-Technik wird in dieser Arbeit das Vorhandensein von *Scg*-FLRF im Zentralkomplex bestätigt. FLRFamid ist ein Neurohormon des Perikardialorgans (Wilkens et al., 1996). Die Funktionen im Zentralkomplex müssen dagegen noch gefunden werden.

Das FLRFamid wirkt als Neurohormon, reguliert den Herzschlag und die Kontraktion der Beinmuskeln. Zusätzlich zeigt FLRFamid myoinhibitorische Effekte auf die Ovidukte in der Heuschrecke (Robb et al., 1989; Robb und Evans, 1990; Peeff et al., 1994). Diese Funktionen sind mit postembryonalen Entwicklungen assoziiert, wie es durch die späte Expression von FLRFamid im embryonalen Heuschreckengehirn (Abbildung 44) zu erwarten ist.

6.3.3.5 Serotonin ein klassischer Transmitter

Die Expression von Serotonin im Zentralkomplex beginnt zwischen 75 und 80% der Embryonalentwicklung in den tangentialen Projektionen (Abbildung 45). Das Expressionsmuster ähnelt dem von *Lom*TK und AST. Immunreaktive Fasern befinden sich in den lateralen akzessorischen Loben, dem Isthmus, im Zentralkörper und in der protocerebralen Brücke (Abbildung 56). Es zeigt sich eine gleichzeitige Expression von 5HT-ICC in den tangentialen Fasern S2 bis S6 des Zentralkomplexes. Das Expressionsmuster gleicht dem in der adulten Heuschrecke (Homberg, 1991). Kolumnare Zellen der Pars intercerebralis werden am Ende der Embryonalentwicklung immunreaktiv.

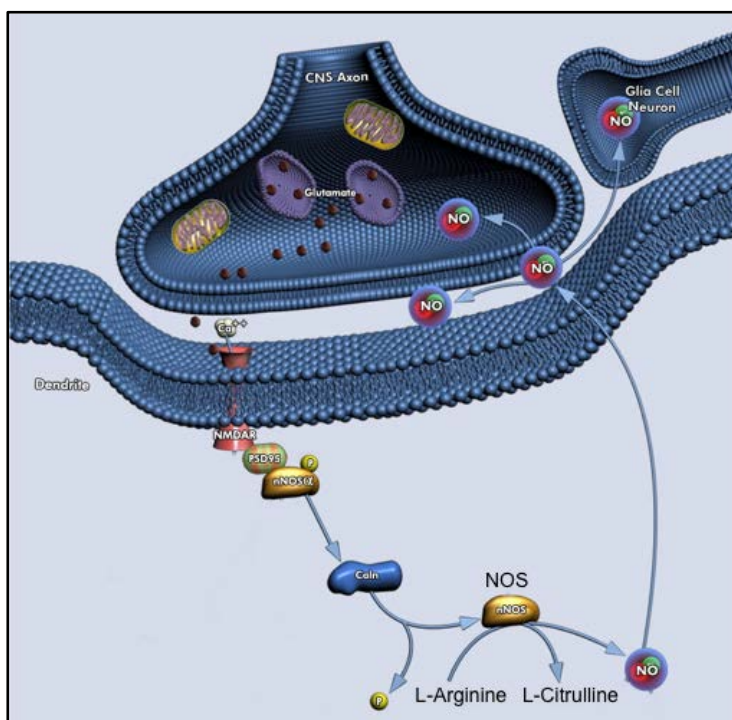
Serotonin koordiniert die biochemische Differenzierung und neuronalen Funktionen (Gaspar et al., 2003). 5HT-ICC ist für wichtige postembryonale Funktionen notwendig, wie die Steuerung des Geruchssinn und der Prämotorik, und zeigt dabei Interaktionen mit anderen neuropeptidergen Systemen im untersuchten Zentralkomplex. Über die embryonalen und larvalen Funktionen von 5HT kann bisher noch keine konkrete Aussage getroffen werden. Vermutlich ist Serotonin jedoch an Entwicklungsprozessen wie der Zelldifferenzierung, der

Neurogenese und der Axogenese beteiligt (Condrón, 1999; Richards et al., 2003; Sykes und Condrón, 2005; Stern et al., 2007). Serotonin zeigt, wie in Abbildung 45 dargestellt, weder im Embryo noch in den Larvalstadien eine Koexpression mit anderen Neuromodulatoren (Boyan et al., 2010a), da diese in unterschiedlichen Projektionen im Zentralkomplex aktiv sind.

In Arthropoden spielt Serotonin eine Rolle im olfaktorischen Verhalten (Kloppenburg et al., 1999). Außerdem zeigte Roeder (2002) eine Beteiligung von Serotonin an der Kontraktionskontrolle der Skelettmuskulatur und der viszeralen Muskulatur im adulten Insekt.

6.3.3.6 Stickstoffmonoxid, ein endogener Botenstoff

Stickstoffmonoxid, das Molekül des Jahres 1992 (Culotta und Koshland, 1992), wirkt als retrograder Botenstoff über den GABA-Signalweg (Abbildung 57) bei der Langzeitpotenzierung von Hippokampus-Neuronen in Vertebraten (Dawson et al., 1992) und als retrograder synaptischer Botenstoff in der Heuschrecke (Bicker, 2001).



Erklärungen Abbildung 57:

- Mitochondrien.
- Transmitter-Vesikel.
- Glutamat.

Abkürzungen in Abbildung 57:

- CNS zentrales Nervensystem.
- NO Stickstoffmonoxid.
- Ca⁺⁺ Calciumionen.
- NMDAR N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor.
- PSD Proteine der „postsynaptischen Dichte“.
- NOS Stickstoffmonoxid-Synthase.
- nNOS neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase.
- P Phosphor
- Caln Calmodulin.

Abbildung 57: NO, ein Gas als Neuromodulator.

Quelle: <http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/Pathway%20Details.aspx?pwid=323>.

NO und dessen Auswirkungen in sich entwickelnden und adulten Nervensystemen von *Schistocerca* sind zum Teil bekannt (Bicker, 1998, 2001; Kiss und Vizi, 2001). Prozesse, die unter anderem durch NO gesteuert werden, sind Zellproliferation (Kuzin et al., 1996), Musterbildung (Gibbs und Truman, 1998), Axogenese (Seidel und Bicker, 2000), Neuronenreifung und Synaptogenese (Truman et al., 1996a, b; Ball und Truman, 1998). Stickstoffmonoxid wirkt als retrograder synaptischer, intrazellulärer und von Synapsen

unabhängiger Botenstoff in der *Scg* und steuert über die Stickstoffmonoxid/zyklisches Guanyl-Mono-Phosphat (NO/cGMP)-Signalkaskade die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und damit die Erregung bzw. Hemmung von neuronalen Zellen (Bicker, 2001). In der Veröffentlichung von Seidel und Bicker (2002) wird über eine NADPHd-Aktivität, die das Vorhandensein von NO anzeigt, im Zentralkomplex der embryonalen Heuschrecke berichtet. Diese Untersuchung zeigt eine starke NADPHd-Aktivität bei 70% der Embryogenese, jedoch nicht die räumliche Verteilung von NO im embryonalen Zentralkomplex.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt (Abbildung 47), dass die NADPHd-Aktivität bei 70% der Embryonalentwicklung im Zentralkomplex in den pontinen Neuronen beginnt. Bis 75% der Embryonalentwicklung erweitert sich die Aktivität auf das tangential System (TL1, TL2) der lateralen akzessorischen Loben sowie des ellipsoiden Körpers und bei 75% der Embryogenese auf das kolumnare System. Die Aktivität im tangentialen Teil des Zentralkomplexes vergrößert sich stufenweise, vermutlich durch die Innervierung der Region mit zusätzlichen Fasern. Die Aktivität im kolumnaren Anteil erscheint abrupt und gleichzeitig in allen Teilen des Systems.

NO wird, wie oben bereits erwähnt, im sich entwickelnden Insektennervensystem mit verschiedenen Prozessen in Verbindung gebracht. Im Zentralkomplex könnte durch NO die Neurogenese, Axogenese und damit die neuronale Verknüpfung der Zentralkomplexeile gesteuert werden. Zudem ist es möglich, dass die Rezeptoren von Synapsen durch NO besetzt werden und damit der Signaltransduktionsweg moduliert wird. Kunst et al. (2011) konnten zeigen, dass NO aus den tangentialen Neuronen des Zentralkörpers über den GABA-Signalweg und dem ellipsoiden Körper die Lauterzeugung bei Heuschrecken moduliert. Zukünftige Studien müssen die genauen Funktionen von NO im sich entwickelnden Zentralkomplex zeigen.

6.3.3.7 Zusammenfassung der Neuromodulatoren-Expressionsmuster

Insgesamt zeigt die Arbeit vergleichbare Ergebnisse in der Ausprägung der Expressionsmuster von Neuropeptiden, Monoaminen und endogenen Botenstoffen in embryonalen Insektennervensystemen, wie sie andere Untersuchungen sowohl im zentralen Nervensystem (Romeuf und Rémy, 1984; Westbrook und Bollenbacher, 1990; Wegerhoff et al., 1996; Bicker, 1998, 2001; Seidel und Bicker, 2002) als auch im ventralen Nervensystem (Goodman et al., 1979; Keshishian und O'Shea, 1985; Eckert et al., 2002; Lee et al., 2008)

beschreiben. Die vorliegende Studie zeigt, dass neuroaktive Substanzen im embryonalen Zentralkomplex von *Schistocerca gregaria* an der chiasmalen, kolumnaren Organisation beteiligt sind. Die genaue Rolle der jeweiligen Neuromodulatoren und Botenstoffe muss im Detail in späteren Studien festgestellt werden.

7 Ausblick

Der Zentralkomplex ist ein hochorganisiertes und essentielles Neuropil im Gehirn von Insekten und Crustaceen. Grundlagenforschung zur Neuronenentwicklung, zu Funktionen spezifischer Zellen im Gehirn und zu molekularen Vorgängen, die auf andere Tiergruppen wie z.B. den Vertebraten übertragbar sind, ist möglich.

Die Entwicklung des z-Traktes des Zentralkomplexes erfolgt in Abhängigkeit des embryonalen Entstehungszeitpunktes des beteiligten Neuroblasten 4-1 (Z) und dessen Entwicklungslinie. Diese zeitliche Abhängigkeit muss für die w-, x- und y-Trakte bestätigt werden. Auch die Entwicklung anderer Zentralkomplextteile, wie die der protocerebralen Brücke, der Noduli mit deren axonalen Verbindungen und die Entwicklung anderer komplexer Neuropile wie die Pilzkörper müssen definiert werden.

Die LCs und PCPs sind mesektodermalen und neuronalen Ursprungs, SCNs dagegen neuroektodermalen Ursprungs. Sie faszikulieren untereinander und bilden den Beginn eines axonalen Gerüsts. Die Zellen entstehen an einem Ort im Gehirn und wandern erst später zu ihren spezifischen Zielen. An dem gebildeten Gerüst orientieren sich z.B. die Axone der Pioniere der w-, x-, y- und z-Trakte und die Axone der ersten Bahnen des visuellen Systems in Lobula und Medulla (Boyan et al., 1995a). Ob weitere Zellen, wie z.B. Gliazellen, am Bau des Gerüsts beteiligt sind, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Neuromodulatoren, biogene Amine und gasförmige Botenstoffe haben vielfältige Funktionen in der Entwicklung und Steuerung von Nervensystemen in Vertebraten sowie Invertebraten. Der Zentralkomplex steuert z.B. die spatiale Orientierung, die Lokomotion und das Gedächtnis. Weitere Funktionen müssen noch genauer untersucht bzw. gefunden werden. Durch Neu- oder Weiterentwicklungen von Methoden wie der Massenspektrometrie oder noch zu spezifizierenden Antikörpern, können genauere Studien der Neuroarchitektur des Zentralkomplexes und dessen Funktionen durchgeführt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Anderson, D.T. 1973. Embryology and phylogeny in annelids and arthropods. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Anstey, M.L., Rogers, S.M., Ott, S.R., Burrows, M., Simpson, S.J. 2009. Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science* 323, 627-630.
- Antle, M.C., LeSauter, J., Silver, R. 2005. Neurogenesis and ontogeny of specific cell phenotypes within the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res* 157, 8-18.
- Arendt, D., Nübler-Jung, K. 1996. Common ground plans in early brain in development in mice and flies. *Bioessays* 18, 255-259.
- Ball, E.E., Truman, J.W. 1998. Developing grasshopper neurons show variable levels of guanylyl cyclase activity on arrival at their targets. *J Comp Neurol* 394, 1-13.
- Bastiani, M.J., Goodman, C.S. 1986. Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. III. Recognition of specific glial pathways. *J Neurosci* 6, 3542-3551.
- Bastiani, M.J., Doe, C.Q., Helfand, S.L., Goodman, C.S. 1985. Neuronal specificity and growth cone guidance in grasshopper and *Drosophila* embryos. *TINS* 8, 257-266.
- Bastiani, M.J., Harrelson, A.L., Snow, P.M., Goodman, C.S. 1987. Expression of Fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell* 48, 745-755.
- Bate, C.M. 1976. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol* 35, 107-123.
- Bate, C.M., Grunewald, E.B. 1981. Embryogenesis of an insect nervous system. II. A second class of precursor cells and the origin of the intersegmental connectives. *J Embryol Exp Morphol* 61, 317-330.
- Bello, B.C., Izergina, N., Caussinus, E., Reichert, H. 2008. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev* 3, 5.
- Bender, J.A., Pollack, A.J., Ritzmann, R.E. 2010. Neural activity in the central complex of the insect brain is linked to locomotor changes. *Curr Biol* 20, 921-926.
- Bentley, D., Caudy, M. 1983. Navigational substrates for peripheral pioneer growth cones: limb-axis polarity cues, limb segment boundaries and guidepost neurons. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 573-585.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M., Toroian-Raymond, A. 1979. Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper *Schistocerca nitens*. *J Embryol Exp Morphol* 54, 47-74.
- Bentley, D., Guthrie, P.B., Kater, S.B. 1991. Calcium ion distribution in nascent pioneer axons and coupled preaxonogenesis neurons in situ. *J Neurosci* 11, 1300-1308.

- Berlot, J., Goodman, C.S. 1984. Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: adhesive hierarchy of epithelial and neuronal surfaces. *Science* 223, 493-496.
- Bicker, G. 1998. NO news from insect brains. *Trends Neurosci* 21, 349-355.
- Bicker, G. 2001. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res* 303, 137-146.
- Boone, J.Q., Doe, C.Q. 2008. Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* 68, 1185-1195.
- Bossing, T., Brand, A.H. 2006. Determination of cell fate along the anteroposterior axis of the *Drosophila* ventral midline. *Development* 133, 1001-1012.
- Bossing, T., Technau, G.M. 1994. The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* 120, 1895-1906.
- Boyan, G.S., Ball, E.E. 1990. Neuronal organization and information processing in the wind-sensitive cercal receptor/giant interneurone system of the locust and other orthopteroid insects. *Prog Neurobiol* 35, 217-243.
- Boyan, G., Liu, Y. 2014. Timelines in the insect brain: fates of identified neural stem cells generating the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev Genes Evol* 224, 37-51.
- Boyan, G.S., Reichert, H. 2011. Mechanisms for complexity in the brain: generating the insect central complex. *Trends Neurosci* 34, 247-257.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D. 1997. Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. *Dev Genes Evol* 207, 317-329.
- Boyan, G., Williams, L. 2000. Building the antennal lobe: *engrailed* expression reveals a contribution from protocerebral neuroblasts in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 29, 267-274.
- Boyan, G., Williams, L. 2002. A single cell analysis of *engrailed* expression in the early embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: ontogeny and identity of the secondary headspot cells. *Arthropod Struct Dev* 30, 207-218.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D. 2004. Embryonic development of the sensory innervation of the antenna of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 33, 381-397.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D. 2007. Embryonic development of a peripheral nervous system: nerve tract associated cells and pioneer neurons in the antenna of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 36, 336-350.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D. 2008. Evidence that the primary brain commissure is pioneered by neurons with a peripheral-like ontogeny in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 37, 186-198.

- Boyan, G., Williams, L. 2011. Embryonic development of the insect central complex: insights from lineages in the grasshopper and *Drosophila*. *Arthropod Struct Dev* 40, 334-348.
- Boyan, G., Williams, L., Meier, T. 1993. Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. *J Comp Neurol* 332, 358-377.
- Boyan, G.S., Therianos, S., Williams, J.L., Reichert, H. 1995a. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. *Development* 121, 75-86.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H. 1995b. Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. *Roux's Arch Dev Biol* 205, 45-53.
- Boyan, G.S., Williams, J.L., Reichert, H. 1995c. Morphogenetic reorganization of the brain during embryogenesis in the grasshopper. *J Comp Neurol* 361, 429-440.
- Boyan, G.S., Reichert, H., Hirth, F. 2003. Commissure formation in the embryonic insect brain. *Arthropod Struct Dev* 32, 61-77.
- Boyan, G.S., Williams, J.L., Herbert, Z. 2008a. An ontogenetic analysis of locust tachykinin-like expression in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 37, 480-491.
- Boyan, G.S., Williams, J.L., Herbert, Z. 2008b. Fascicle switching generates a chiasmal neuroarchitecture in the embryonic central body of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 37, 539-544.
- Boyan, G., Williams, L., Herbert, Z. 2010a. Multipotent neuroblasts generate a biochemical neuroarchitecture in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 340, 13-28.
- Boyan, G., Williams, L., Legl, A., Herbert, Z. 2010b. Proliferative cell types in embryonic lineages of the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 341, 259-277.
- Boyan, G., Loser, M., Williams, L., Liu, Y. 2011. Astrocyte-like glia associated with the embryonic development of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev Genes Evol* 221, 141-155.
- Boyan, G.S., Liu, Y., Loser, M. 2012. A cellular network of dye-coupled glia associated with the embryonic central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev Genes Evol* 222, 125-138.
- Boyan, G., Williams, L., Götz, S. 2013. Postembryonic development of astrocyte-like glia of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 351, 361-72.
- Broadus, L., Doe, C.D. 1995. Evolution of neuroblast identity: *seven-up* and *prospero* expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development* 121, 3989-3996.

- Broadus, J., Skeath, J.B., Spana, E.P., Bossing, T., Technau, G., Doe, C.Q. 1995. New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* nervous system. *Mech Dev* 53, 393-402.
- Buescher, M., Hing, F.S., Chia, W. 2002. Formation of neuroblasts in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by SoxNeuro. *Development* 129, 4193-4203.
- Bullock, T.H., Horridge, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, Vol. 2. Freeman, San Francisco.
- Burrows, M. 1996. *The neurobiology of an insect Brain*. Oxford University Press, Oxford.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V. 1997. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Second ed. Springer, Berlin.
- Carrow, G.M., Calabrese, R.L., Williams, C.M. 1984. Architecture and physiology of insect cerebral neurosecretory cells. *J Neurosci* 4, 1034-1044.
- Catalani, E., Dal Monte, M., Gangitano, C., Lucattelli, M., Fineschi, S., Bosco, L., Bagnoli, P., Casini, G. 2006. Expression of substance P, neurokinin 1 receptors (NK1) and neurokinin 3 receptors in the developing mouse retina and in the retina of NK1 knockout mice. *Neuroscience* 138, 487-499.
- Cayre, M., Strambi, C., Strambi, A. 1994. Neurogenesis in an adult insect brain and its hormonal control. *Nature* 368, 57-59.
- Cayre, M., Strambi, C., Charpin, P., Augier, R., Meyer, M.R., Edwards, J.S., Strambi, A. 1996. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. *J Comp Neurol* 371, 300-310.
- Cayre, M., Scotto-Lomassese, S., Malaterre, J., Strambi, C., Strambi, A. 2007. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the house cricket. *Chem Senses* 32, 385-395.
- Chiang, A.S., Pszczolkowski, M.A., Lee, C.M., Wei, T.W. 1999. Protocerebral neurons inhibiting proliferation of corpus allatum cells in the cockroach, *Diploptera punctata*. *J Comp Neurol* 413, 593-602.
- Clynen, E., Huybrechts, J., De Loof, A., Schoofs, L. 2003a. Mass spectrometric analysis of the perisymphathetic organs in locusts: identification of novel periviscerokinins. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 422-228.
- Clynen, E., Baggerman, G., Huybrechts, J., Vanden Bosch, L. De Loof, A., Schoofs, L. 2003b. Peptidomics of the locust corpora allata: Identification of novel pyrokinins (-FXPRLamides). *Peptides* 24, 1493-1500.
- Clynen, E., Husson, S.J., Schoofs, L. 2009. Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 1163, 60-74.
- Condrón, B.G. 1999. Serotonergic neurons transiently require a midline-derived FGF signal. *Neuron* 24, 531-540.

- Condrón, B.G., Zinn, K. 1994. The grasshopper median neuroblast is a multipotent progenitor cell that generates glia and neurons in distinct temporal phases. *J Neurosci* 14, 5766-5777.
- Condrón, B., Zinn, K. 1998. Dopaminergic control of serotonergic neuron development in the grasshopper central nervous system. *Adv Pharmacol* 42, 949-951.
- Copenhaver, P.F., Truman, J.W. 1986. Identification of the cerebral neurosecretory cells that contain eclosion hormone in the moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* 6, 1738-1747.
- Copenhaver, P.F., Taghert, P.H. 1989. Development of the enteric nervous system in the moth. II. Stereotyped cell migration precedes the differentiation of embryonic neurons. *Dev Biol* 131, 85-101.
- Crecelesius, A.C., Cornett, D.S., Caprioli, R.M., Williams, B., Dawant, B.M., Bodenheimer, B. 2005. Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 16, 1093-1099.
- Crews, S.T., Thomas, J.B., Goodman, C.S. 1988. The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell* 52, 143-151.
- Culotta, E., Koshland, D.E. jr. 1992. NO news is good news. *Science* 258, 1862-1865.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L., Snyder, S.H. 1992. A novel neuronal messenger molecule in the brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32, 297-311.
- Dirksen, H., Skiebe, P., Abel, B., Agricola, H., Buchner, K., Muren, J.E., Nässel, D.R. 1999. Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 20, 695-712.
- Doe, C.Q. 2008. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* 135, 1575-1587.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S. 1985a. Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111, 193-205.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S. 1985b. Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111, 206-219.
- Doe, C.Q., Skeath, J.B. 1996. Neurogenesis in the insect nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6, 18-24.
- Dumstrei, K., Nassif, C., Abboud, G., Aryai, A., Aryai, A., Hartenstein, V. 1998. EGFR signaling is required for the differentiation and maintenance of neural progenitors along the dorsal midline of the *Drosophila* embryonic head. *Development* 125, 3417-3426.
- Eckert, M., Predel, R., Gundel, M. 1999. Periviscerokinin-like immunoreactivity in the nervous system of the American cockroach. *Cell Tissue Res* 295, 159-170.
- Eckert, M., Herbert, Z., Pollák, E., Molnár, L., Predel, R. 2002. Identical cellular distribution of all abundant neuropeptides in the major abdominal neurohemal system of an insect (*Periplaneta americana*). *J Comp Neurol* 452, 264-275.

- El Jundi, B., Homberg, U. 2012. Receptive field properties and intensity-response functions of polarization-sensitive neurons of the optic tubercle in gregarious and solitary locusts. *J Neurophysiol* 108, 1695-1710.
- Farris, S.M. 2005. Evolution of insect mushroom bodies: old clues, new insights. *Arthropod Struct Dev* 34, 211-234.
- Farris, S.M. 2008. Evolutionary convergence of higher brain centers spanning the protostome-deuterostome boundary. *Brain Behav Evol* 72, 106-122.
- Farris, S.M. 2011. Are mushroom bodies cerebellum-like structures?. *Arthropod Struct Dev* 40, 368-379.
- Farris, S.M., Sinakevitch, I. 2003. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. *Arthropod Struct Dev* 32, 79-101.
- Feller, M.B. 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22, 653-656.
- Fjose, A., McGinnis, W., Gehring, W.J. 1985. Isolation of a homeobox-containing gene from the *engrailed* region of the *Drosophila* and the spatial distribution of its transcript. *Nature* 313, 284-289.
- Ganforina, M.D., Sánchez, D., Bastiani, M.J. 1995. Lazarillo, a new GPI-linked surface Lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo. *Development* 121, 123-134.
- Ganforina, M.D., Sánchez, D., Bastiani, M.J. 1996. Embryonic development of the enteric nervous system of the grasshopper *Schistocerca americana*. *J Comp Neurol* 372, 581-596.
- Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4, 1002-1012.
- Gibbs, S.M., Truman, J.W. 1998. Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* 20, 83-93.
- Goodman, L.J. 1981. In: Autrum, H. (Ed.), Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system, *Handbook of Sensory Physiology*. Vol. VII 6C, 201-286. Springer Verlag, Berlin und Heidelberg.
- Goodman, C.S., Doe, C.Q. 1993. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), *The Development of Drosophila*. Vol. 1, 1131-1206. Cold Spring Harbor, New York.
- Goodman, C.S., Spitzer, N.C. 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. *Nature* 280, 208-214.
- Goodman, C.S., O'Shea, M., McCaman, R., Spitzer, N.C. 1979. Embryonic development of identified neurons: temporal pattern of morphological and biochemical differentiation. *Science* 204, 1219-1222.
- Goodman, C.S., Pearson, K.G., Spitzer, N.C. 1980. Electrical excitability: a spectrum of properties in the progeny of a single embryonic neuroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1676-1680.

- Graf, S., Ludwig, P., Boyan, G.S. 2000. Lazarillo reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 419, 394-405.
- Haller, B. 1905. Über den allgemeinen Bauplan des Tracheatensyncerebrums. *Arch f mikroskop Anat* 65, 181-279.
- Hartenstein, V., Spindler, S., Pcreanu, W., Fung, S. 2008. The development of the *Drosophila* larval brain. *Adv Exp Med Biol* 628, 1-31.
- Harzsch, S. 2003. Ontogeny of the ventral nerve cord in malacostracan crustaceans: a common plan for neuronal development in Crustacea, Hexapoda and other Arthropoda? *Arthropod Struct Dev* 32, 17-37.
- Heinrich, R., Wenzel, B., Elsner, N. 2001. Pharmacological brain stimulation releases elaborate stridulatory behaviour in gomphocerine grasshoppers – conclusions for the organization of the central nervous control. *J Comp Physiol A* 187, 155-169.
- Heinze, S., Homberg, U. 2007. Maplike representation of celestial E-vector orientation in the brain of an insect. *Science* 315, 995-997.
- Heinze, S., Homberg, U. 2009. Linking the input to the output: new sets of neurons complement the polarization vision network in the locust central complex. *J Neurosci* 29, 4911-4921.
- Hidalgo, A., Booth, G.E. 2000. Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 127, 393-402.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K. 1995. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. *Neuron* 15, 769-778.
- Ho, R.K., Goodman, C.S. 1982. Peripheral pathways are pioneered by an array of central and peripheral neurones in grasshopper embryos. *Nature* 297, 404-406.
- Holman, G.M., Cook, B.J., Nachman, R.J. 1986. Primary structure and synthesis of a blocked myotropic neuropeptide isolated from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Comp Biochem Physiol C* 85, 219-224.
- Homberg, U. 1987. Structure and functions of the central complex in insects. In: Gupta, A.P. (Ed.), *Arthropod brain: its evolution, development, structure and functions*. Wiley, New York, 347-367.
- Homberg, U. 1991. Neuroarchitecture of the central complex in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* and *S. americana* as revealed by serotonin immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 302, 245-254.
- Homberg, U. 1994. Distribution of Neurotransmitters in the Insect Brain. *Progress in Zoology*, vol. 40. Fischer, New, York.
- Homberg, U. 2002. Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microsc Res Tech* 56, 189-209.

- Homberg, U. 2008. Evolution of the central complex in the arthropod brain with respect to the visual system. *Arthropod Struct Dev* 37, 347-362.
- Homberg, U, Davis, N.T., Hildebrand, J.G. 1991a. Peptide-immunocytochemistry of neurosecretory cells in the brain and retrocerebral complex of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 303, 35-52.
- Homberg, U., Würden, S., Dircksen, H., Rao, K.R. 1991b. Comparative anatomy of the pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurones in the brain of orthopteroid insects. *Cell Tiss Res* 266, 343-357.
- Homberg, U., Vitzthum, H., Müller, M., Binkle, U. 1999. Immunocytochemistry of GABA in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*: identification of immunoreactive neurons and colocalization with neuropeptides. *J Comp Neurol* 409, 495-507.
- Homberg, U., Heinze, S., Pfeiffer, K., Kinoshita, M., El Jundi, B. 2011. Central neural coding of sky polarization in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 680-687.
- Horvitz, H.R., Ellis, H.M., Sternberg, P.W. 1982. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment* 1, 56-65.
- Howse, P.E., Williams, J.L.D. 1969. The Brains of Social Insects in Relation to Behaviour. *Proceedings VI Congress of the International Union for the Study of Social Insects*. Bern. 59-64.
- Huber, F. 1960. Untersuchungen über die Funktion des Zentralnervensystems und insbesondere des Gehirns bei der Fortbewegung und der Lauterzeugung der Grillen. *Z Vergl Physiol* 44, 60-132.
- Imms, A.D. 1967. *Outlines of Entomology*. Methuen and Co, London.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D. 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.
- Izergina, N., Balmer, J., Bello, B., Reichert, H. 2009. Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev* 4, 44.
- Jacobs, J.R., Goodman, C.S. 1989a. Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. *J Neurosci* 9, 2402-2411.
- Jacobs, J.R., Goodman, C.S. 1989b. Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. II. Behavior of pioneer growth cones. *J Neurosci* 9, 2412-2022.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N. 1982. Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2700-2704.
- Jessel, T.M. 1988 Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. *Neuron* 1, 3-13.
- Kahsai, L., Zars, T. 2011. Learning and memory in *Drosophila*: behavior, genetics, and neural systems. *Int Rev Neurobiol* 99, 139-167.

- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.H. 1991. Principles of Neural Science. 3.ed. Appleton & Lange.
- Keshishian, H., Bentley, D. 1983. Embryogenesis of peripheral nerve pathways in grasshopper legs. I. The initial nerve pathway to the CNS. *Dev Biol* 96, 89-102.
- Keshishian, H., O'Shea, M. 1985. The acquisition and expression of a peptidergic phenotype in the grasshopper embryo. *J Neurosci* 5, 1005-1015.
- Kim, M.Y., Lee, B.H., Kwon, D., Kang, H., Nässel, D.R. 1998. Distribution of tachykinin-related neuropeptide in the developing central nervous system of the moth *Spodoptera litura*. *Cell Tissue Res* 294, 351-365.
- Kiss, J.P., Vizi, E.S. 2001. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24, 211-215.
- Klämbt, C. 2009. Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci* 10, 769-779.
- Klämbt, C., Jacobs, J.R., Goodman, C.S. 1991. The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64, 801-815.
- Kloppenborg, P., Ferns, D., Mercer, A.R. 1999. Serotonin enhances central olfactory neuron responses to female sex pheromone in the male sphinx moth *Manduca sexta*. *J Neurosci* 19, 8172-8181.
- Kornberg, T., Sidén, I., O'Farrel, P., Simon, M. 1985. The *engrailed* locus of *Drosophila*: *in situ* localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40, 45-53.
- Kotrla, K.J., Goodman, C.S. 1984. Transient expression of a surface antigen on a small subset of neurones during embryonic development. *Nature* 311, 151-153.
- Kreissl, S., Weiss, T., Djokai, S., Balezina, O., Rathmayer, W. 1999. Allatostatin modulates skeletal muscle performance in crustaceans through pre- and postsynaptic effects. *Eur J Neurosci* 11, 2519-2530.
- Kumar, A., Bello, B., Reichert, H. 2009. Lineage-specific programmed cell death in postembryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 136, 3433-3442.
- Kunst, M., Pförtner, R., Aschenbrenner, K., Heinrich, R. 2011. Neurochemical architecture of the central complex related to its function in the control of grasshopper acoustic communication. *PLoS One* 6, e25613 (ePub).
- Kurylas, A.E., Ott, S.R., Schachtner, J., Elphick, M.R., Williams, L., Homberg, U. 2005. Localization of nitric oxide synthase in the central complex and surrounding midbrain neuropils of the locust *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 484, 206-223.
- Kutsch, W., Bentley, D. 1987. Programmed death of peripheral pioneer neurons in the grasshopper embryo. *Dev Biol* 123, 517-525.

- Kuwada, J.Y., Goodman, C.S. 1985. Neuronal determination during embryonic development of the grasshopper nervous system. *Dev Biol* 110, 114-126.
- Kuzin, B., Roberts, I., Peunova, N., Enikolopov, G. 1996. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 639-649.
- Lawrence, P.A., Johnston, P. 1989. Analysis of function of the pair-rule genes *hairy*, *even-skipped* and *fushi tarazu* in mosaic *Drosophila* embryos. *Development* 107, 847-853.
- Lee, G., Kim, K.M., Kikuno, K., Wang, Z., Choi, Y.J., Park, J.H. 2008. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tiss Res* 331, 659-673.
- Leise, E.M. 1990. Modular construction of nervous systems: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates. *Brain Res Rev* 15, 1-23.
- Leuzinger, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W.J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., Reichert, H. 1998. Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125, 1703-1710.
- Levi-Montalcini, R., Callissano, P. 1979. The nerve growth factor. *Sci Am* 240, 68-77.
- Liu, Y., Boyan, G. 2013. Glia associated with central complex lineages in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev Genes Evol* 223, 213-223.
- Liu, G., Seiler, H., Wen, A., Zars, T., Ito, K., Wolf, R., Heisenberg, M., Liu, L. 2006. Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* 439, 551-556.
- Locke, M., Huie, P. 1981. Epidermal feet in insect morphogenesis. *Nature* 293, 733-735.
- Loesel, R., Nässel, D.R., Strausfeld, N.J. 2002. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods. *Arthropod Struct Dev* 31, 77-91.
- Ludwig, P., Williams J.L., Lodde, E., Reichert, H., Boyan, G.S. 1999. Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 414, 379-390.
- Ludwig, P., Williams, L., Nässel, D.R., Reichert, H., Boyan, G. 2001. Primary commissure pioneer neurons in the brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: development, ultrastructure, and neuropeptide expression. *J Comp Neurol* 430, 118-130.
- Ludwig, P., Williams, L., Boyan, G. 2002. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. *Microsc Res Tech* 56, 174-188.
- Malzacher, P. 1968. Die Embryogenese des Gehirns paurometaboler Insekten. Untersuchungen an *Carausius morosus* und *Periplaneta americana*. *Z Morph Tiere* 62, 103-161.
- Martin, J.R., Raabe, T., Heisenberg, M. 1999. Central complex substructures are required for the maintenance of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 185, 277-288.

- Meier, T., Therianos, S., Zacharias, D., Reichert, H. 1993. Developmental expression of TERM-1 glycoprotein on growth cones and terminal arbors of individual identified neurons in the grasshopper. *J Neurosci* 13, 1498-1510.
- Meinertzhagen, I.A. 1973. Development of the compound eye and optic lobe of insects. In: Young, D. (Ed.), *Developmental Neurobiology of Arthropods*, Cambridge University Press, Cambridge, 51-103.
- Meinertzhagen, I.A., Emsley, J.G., Sun, X.J. 1998. Developmental anatomy of the *Drosophila* brain: neuroanatomy is gene expression. *J Comp Neurol* 402, 1-9.
- Mizunami, M., Iwasaki, M., Nishikawa, M., Okada, R. 1997. Modular structures in the mushroom body of the cockroach. *Neurosci Lett* 229, 153-156.
- Mobbs, P.G. 1976. Development of the locust ocellus. *Nature* 264, 269-271.
- Moody, W.J., Bosma, M.M. 2005. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 85, 883-941.
- Myers, P.Z., Bastiani, M.J. 1993a. Cell-cell interactions during the migration of an identified commissural growth cone in the embryonic grasshopper. *J Neurosci* 13, 115-126.
- Myers, P.Z., Bastiani, M.J., 1993b. Growth cone dynamics during the migration of an identified commissural growth cone. *J Neurosci* 13, 127-143.
- Nässel, D.R. 1993a. Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tiss Res* 273, 1-29.
- Nässel, D.R. 1993b. Insect myotropic peptides: differential distribution of locust tachykinin- and leucokinin-like immunoreactive neurons in the locust brain. *Cell Tissue Res* 274, 27-40.
- Nässel, D.R. Kim, M.Y., Lundquist, C.T. 1995. Several forms of callitachykinins are distributed in the central nervous system and intestine of the blow fly *Calliphora vomitoria*. *J Exp Biol* 198, 2527-2536.
- Nässel, D.R., Winther, A.M. 2002. Neuronal co-localization of different isoforms of tachykinin-related peptides (*LemTRPs*) in the cockroach brain. *Cell Tiss Res* 308, 225-239.
- Nambu, J.R., Franks, R.G., Hu, S., Crews, S.T. 1990. The *single-minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63, 63-75.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A. jr., Crews, S.T. 1991. The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157-1167.
- Neupert, S., Predel, R. 2010. Peptidomic analysis of single identified neurons. *Methods Mol Biol* 615, 137-144.
- Neupert, S., Johard, H.A., Nässel, D.R., Predel, R. 2007. Single-cell peptidomics of *Drosophila melanogaster* neurons identified by Gal4-driven fluorescence. *Anal Chem* 79, 3690-3694.

- Neupert, S., Schattschneider, S., Predel, R. 2009. Allatotropin-related peptide in cockroaches: identification via mass spectrometric analysis of single identified neurons. *Peptides* 30, 489-494.
- Neuser, K., Triphan, T., Mronz, M., Poeck, B., Strauss, R. 2008. Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453, 1244-1247.
- Ng, S.C., Perkins, L.A., Conboy, G., Perrimon, N., Fishman, M.C. 1989. A *Drosophila* gene expressed in the embryonic CNS shares one conserved domain with the mammalian GAP-43. *Development* 105, 629-638.
- Nichols, R. 1992. Isolation and structural characterization of *Drosophila* TDVDHVFLRFamid and FMRFamid-containing neural peptides. *J Mol Neurosci* 3, 213-218.
- Noordermeer, J.N., Kopczynski, C.C., Fetter, R.D., Bland, K.S., Chen, W.Y., Goodman, C.S. 1998. Wrapper, a novel member of the Ig superfamiliy, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in *Drosophila*. *Neuron* 21, 991-1001.
- Nordlander, R.H., Edwards, J.S. 1969. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus* L. II. The optic lobes. *Wilhelm Roux Arch* 163, 197-220.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- O'Shea, M., Colbert, R., Williams, L., Dunn, S. 1998. Nitric oxide compartments in the mushroom bodies of the locust brain. *Neuroreport* 9, 333-336.
- Page, D.T. 2004. A mode of arthropod brain evolution suggested by *Drosophila* commissure development. *Evol Dev* 6, 25-31.
- Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z., Liu, L. 2009. Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn Mem* 16, 289-295.
- Panov, A.A. 1960. The structure of the insect brain during successive stages of postembryonic development. III. Optic lobes. *Entomological Review* 39, 55-69.
- Patel, N.H., Kornberg, T.B., Goodman, C.S. 1989. Expression of *engrailed* during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* 107, 201-212.
- Patel, N.H., Ball, E.E., Goodman, C.S. 1992. Changing role of *even-skipped* during the evolution of insect pattern formation. *Nature* 357, 339-342.
- Pearson, K.G., Boyan, G.S., Bastiani, M., Goodman, C.S. 1985. Heterogenous properties of segmentally homologous interneurons in the ventral nerve cord of locusts. *J Comp Neurol* 233, 133-145.
- Peeff, N.M., Orchard, I., Lange, A.B. 1994. Isolation, sequence, and bioactivity of PDVDHVFLRFamide and ADVGHVFLRFamide peptides from the locust central nervous system. *Peptides* 15, 387-392.

- Predel, R., Wegener, C. 2006. Biology of the CAPA peptides in insects. *Cell Mol Life Sci* 63, 2477-2490.
- Predel, R., Herbert, Z., Eckert, M. 2003. Neuropeptides in perisymphathetic organs of *Manduca sexta*: specific composition and changes during the development. *Peptides* 24, 1457-1464.
- Price, D.A., Greenberg, M.J. 1977. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep Biochem* 7, 261-281.
- Raabe, M. 1989. Recent developments in insect neurohormones. Plenum, New York.
- Rankin, S.M., Stay, B., Chan, K., Jackson, E.S. 1998. Cockroach allatostatin-immunoreactive neurons and effects of cockroach allatostatin in earwigs. *Arch Insect Biochem Physiol* 38, 155-165.
- Rehm, K.J., Deeg, K.E., Marder, E. 2008. Developmental regulation of neuromodulator function in the stomatogastric ganglion of the lobster, *Homarus americanus*. *J Neurosci* 28, 9828-9839.
- Reichert, H., Boyan, G. 1997. Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci* 20, 258-264.
- Renn, S.C., Armstrong, J.D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., Taghert, P.H. 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J Neurobiol* 41, 189-207.
- Richards, K.S., Simon, D.J., Pulver, S.R., Beltz, B.S. Marder, E. 2003. Serotonin in the developing stomatogastric system of the lobster, *Homarus americanus*. *J Neurobiol* 54, 380-392.
- Richter, S., Hartmann, B., Reichert, H. 1998. The *wingless* gene is required for embryonic brain development in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 208, 37-45.
- Ritzmann, R.E., Ridgel, A.L., Pollack, A.J. 2008. Multi-unit recording of antennal mechano-sensitive units in the central complex of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 194, 341-360.
- Robb, S., Evans, P.D. 1990. FMRFamide-like peptides in the locust: distribution, partial characterization and bioactivity. *J Exp Biol* 149, 335-360.
- Robb, S., Evans, P.D. 1994. The modulatory effect of SCHISTOFLRFamide on heart and skeletal muscle in the locust *Schistocerca gregaria*. *J Exp Biol* 197, 437-442.
- Robb, S., Packman, L.C., Evans, P.D. 1989. Isolation, primary structure and bioactivity of schistoflrf-amid, a FMRF-amide-like neuropeptide from the locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 850-856.
- Roeder, T. 2002. Biochemistry and molecular biology of receptors for biogenic amines in locusts. *Microsc Res Tech* 56, 237-247.
- Rogers, S.M., Matheson, T., Despland, E., Dodgson, T., Burrows, M., Simpson, S.J. 2003. Mechanosensory-induced behavioural gregarization in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Exp Biol* 206, 3991-4002.

- Rogers, S.M., Matheson, T., Sasaki, K., Kendrick, K., Simpson, S.J., Burrows, M. 2004. Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust. *J Exp Biol* 207, 3603-3617.
- Romeuf, M., Rémy, C. 1984. Early immunohistochemical detection of somatostatin-like and methionine-enkephalin-like neuropeptides in the brain of the migratory locust embryo. *Cell Tiss Res* 236, 289-292.
- Rowell, H.F. 1976. The cells of the insect neurosecretory system: constancy, variability, and the concept of the unique identifiable neuron. *Adv Insect Physiol* 12, 63-123.
- Ruiz, M., Sánchez, D., Correnti, C., Strong, R.K., Ganfornina, M.D. 2013. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J* 280, 3928-3943.
- Sánchez, D., Ganfornina, M.D., Bastiani, M.J. 1995. Developmental expression of the lipocalin Lazarillo and its role in axonal path finding in the grasshopper embryo. *Development* 121, 135-147.
- Sandell, J.H., Masland, R.H. 1988. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J Histochem Cytochem* 36, 555-559.
- Sanes, D.H., Reh, T.A., Harris, W.A. 2011. Development of the nervous system. Academic Press.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S., Gelbart, W.M. 1995. Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of *decapentaplegic* and patched expression by *engrailed*. *Genetics* 139, 745-756.
- Satake, H., Kawada, T., Nomoto, K., Minakata, H. 2003. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: A review. *Zoolog Sci* 20, 533-549.
- Schinko, J.B., Kreuzer, N., Offen, N., Posnien, N., Wimmer, E.A., Bucher, G. 2008. Divergent function of *orthodenticle*, *empty spiracles* and *buttonhead* in early head patterning of the beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera). *Dev Biol* 317, 600-613.
- Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A., Klämbt, C. 1997. Control of midline glia development in the embryonic *Drosophila* CNS. *Mech Dev* 64, 137-151.
- Schoofs, L., Veelaert, D., Vanden Broeck, J., De Loof, A. 1997. Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 18, 145-156.
- Schoofs, L., Janssen, I., Veelaert, D., Vanden Broeck, J., Tobe, S.S., De Loof, A. 1998. Ecdysio-statins and allatostatins in *Schistocerca gregaria*. *Ann N Y Acad Sci* 15, 301-305
- Schooneveld, H. 1974. Ultrastructure of the neurosecretory system of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). I. Characterization of the protocerebral neurosecretory cells. *Cell Tiss Res* 154, 275-288.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., Goodman, C.S. 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10, 409-426.

- Seidel, C., Bicker, G. 2000. Nitric oxide and cGMP influence axogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 127, 4541-4549.
- Seidel, C., Bicker, G. 2002. Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathways in the brain of the embryonic grasshopper. *Brain Res Dev Brain Res* 138, 71-79.
- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Ersparmer, G., Salvadori, S., Ersparmer, V. 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54, 285-322.
- Simmonds, A.J., Brook, W.J., Cohen, S.M., Bell, J.B. 1995. Distinguishable functions for *engrailed* and *invected* in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* 376, 424-427.
- Skeath, J.B., Thor, S. 2003. Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* 13, 8-15.
- Smits van Prooije, A.E., Poelmann, R.E., Dubbeldam, J.A., Mentink, M.M., Vermeij-Keers, C. 1986. Wheat-germ agglutinin-gold as a novel marker for mesectoderm formation in mouse embryos cultured in vitro. *Stain Technol* 61, 97-106.
- Snow, P.M., Patel, N.H., Harrelson, A.L., Goodman, C.S. 1987. Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J Neurosci* 7, 4137-4144.
- Sonnenfeld, M.J., Jacobs, J.R. 1994. Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants. *Mech Dev* 46, 3-13.
- St. Johnston, D., Nüsslein-Volhard, C. 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.
- Stay, B., Tobe, S.S. 2007. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans. *Annu Rev Entomol* 52, 277-299.
- Stern, M., Knipp, S., Bicker, G. 2007. Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). *J Comp Neurol* 501, 38-51.
- Stevenson, P.A., Kutsch, W. 1986. Basic circuitry of an adult specific motor program completed with embryogenesis. *Naturwissenschaften* 73, 741-743.
- Strausfeld, N.J. 1976. *Atlas of an Insect Brain*. Springer, Berlin.
- Strausfeld, N.J. 1998. Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav Evol* 52, 186-206.
- Strausfeld, N.J. 2012. *Arthropod Brains: Evolution, Functional Elegance, and Historical Significance*. The Belknap Press of Harvard University Press.
- Strausfeld, N.J., Hirth, F. 2013. Deep homology of arthropod central complex and vertebrate basal ganglia. *Science* 340, 157-161.

- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., Ito, K. 1998. Evolution, discovery, and interpretation of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem* 5, 11-37.
- Strauss, R. 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12, 633-638.
- Strauss, R., Heisenberg, M. 1993. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13, 1852-1861.
- Strauss, R., Hanesch, U., Kinkelin, M., Wolf, R., Heisenberg, M. 1992. *No-bridge* of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex. *J Neurogenet* 8, 125-155.
- Strecker, T.R., Merriam, J.R. 1986. *krippel* and *tailless* affect complementary regions of the segmented *Drosophila* embryo. *Prog Clin Biol Res* 217A, 289-292.
- Sykes, P.A., Condrón, B.G. 2005. Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila* serotonergic varicosities in the central nervous system. *Dev Biol* 286, 207-216.
- Taghert, P.H., Doe, C.Q., Goodman, C.S. 1984. Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. *Nature* 307, 163-165.
- Tettamanti, M., Armstrong, J.D., Endo, K., Yang, M.Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., Reichert, H. 1997. Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Dev Genes Evol* 207, 242-252.
- Thomas, J.B., Crews, S.T., Goodman, C.S. 1988. Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52, 133-141.
- Tomaselli, K.J., Neugebauer, K.M., Bixby, J.L., Lilien, J., Reichardt, L.F. 1988. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surface. *Neuron* 1, 33-43.
- Tomer, R., Denes, A.S., Tessmar-Raible, K., Arendt, D. 2010. Profiling by image registration reveals common origin of annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* 142, 800-809.
- Torfs, H., Shariatmadari, R., Guerrero, F., Parmentier, M., Poels, J., Van Poyer, W., Swinnen, E., De Loof, A., Akerman, K., Vanden Broeck, J. 2000. Characterization of a receptor for insect tachykinin-like peptide agonists by functional expression in a stable *Drosophila* Schneider 2 cell line. *J Neurochem* 74, 2182-2189.
- Träger, U., Homberg, U. 2011. Polarization-sensitive descending neurons in the locust: connecting the brain to thoracic ganglia. *J Neurosci* 31, 2238-2247.
- Träger, U., Wagner, R., Bausenwein, B., Homberg, U. 2008. A novel type of microglomerular synaptic complex in the polarization vision pathway of the locust brain. *J Comp Neurol* 506, 288-300.
- Truman, J.W., de Vente, J., Ball, E.E. 1996a. Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. *Development* 122, 3949-3958.

- Truman, J.W., Ewer, J., Ball, E.E. 1996b. Dynamics of cyclic GMP levels in identified neurones during ecdysis behaviour in the locust *Locusta migratoria*. *J Exp Biol* 199, 749-758.
- Urbach, R., Technau, G.M. 2003. Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Struct Dev* 32, 103-123.
- Urbach, R., Technau, G.M. 2004. Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *BioEssays* 26, 739-751.
- Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G.M. 2003a. The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expressing during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130, 3589-3606.
- Urbach, R., Technau, G.M., Breidbach, O. 2003b. Spatial and temporal pattern of neuroblasts, proliferation, and Engrailed expression during early brain development in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Arthropod Struct Dev* 32, 125-140.
- Vitzthum, H., Homberg, U. 1998. Immunocytochemical demonstration of locustatachykinin-related peptides in the central complex of the locust brain. *J Comp Neurol* 390, 455-469.
- Vitzthum, H., Homberg, U., Agricola, H. 1996. Distribution of *Dip*-allatostatin I-like immunoreactivity in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* with detailed analysis of immunostaining in the central complex. *J Comp Neurol* 369, 419-437.
- Vitzthum, H., Müller, M., Homberg, U. 2002. Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J Neurosci* 22, 1114-1125.
- Wegerhoff, R., Breidbach, O. 1992. Structure and development of the larval central complex in a holometabolous insect, the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell Tiss Res* 268, 341-358.
- Wegerhoff, R., Breidbach, O., Lobemeier, M. 1996. Development of locustatachykinin immunopositive neurons in the central complex of the beetle *Tenebrio molitor*. *J Comp Neurol* 375, 157-166.
- Weiner, A.J., Scott, M.P., Kaufmann, T.C. 1984. A molecular analysis of *fushi tarazu*, a gene in *Drosophila melanogaster* that encodes a product affecting embryonic segment number and cell fate. *Cell* 37, 843-851.
- Weir, P.T., Dickinson, M.H. 2012. Flying *Drosophila* orient to sky polarization. *Curr Biol* 22, 21-27.
- Westbrook, A.L., Bollenbacher, W.E. 1990. The development of identified neurosecretory cells in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 140, 291-299.
- Weyer, F. 1935. Über drüsenartige Nervenzellen im Gehirn der Honigbiene, *Apis mellifica*. *L Zool Anz* 112, 137-141.
- White, R.A., Lehmann, R. 1986. A gap gene, *hunchback*, regulates the spatial expression of Ultrabithorax. *Cell* 47, 311-321.

- White, J., Southgate, E., Thomson, N., Brenner, S. 1976. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc London B 275, 327–348.
- Whittington, P.M., Meier, T., King, P. 1991. Segmentation, neurogenesis and formation of early axonal pathways in the centipede, *Ethmostigmus rubripes* (Brandt). Roux's Arch Dev Biol 199, 349-363.
- Whittington, P.M., Leach, D., Sandeman, R. 1993. Evolutionary change in neural development within arthropods: axogenesis in the embryos of two crustaceans. Development 118, 449-461.
- Wigglesworth, V.B. 1957. The use of osmium in the fixation and staining of tissues. Proc R Soc Lond B Biol Sci 147, 185-199.
- Wigglesworth, V.B. 1975. Lipid staining for the electron microscope: a new method. J Cell Sci 19, 425-437.
- Wigglesworth, V.B. 1988. Histological staining of lipids for the light and electron microscope. Biol Rev Camb Philos Soc 63, 417-431. Review.
- Wilkins, J.L., Kuramoto, T., McMahon, B.R. 1996. The effects of six pericardial hormones and hypoxia on the semi-isolated heart and sternal arterial valve of the lobster *Homarus americanus*. Comp Biochem Physiol C 114, 57-65.
- Williams, J.L.D. 1972. Some observations on the neuronal organisation of the supra-oesophageal ganglion in *Schistocerca gregaria* (Forskål) with particular reference to the central complex. PhD thesis Univ. of Wales, Cardiff.
- Williams, J.L.D. 1975. Anatomical studies of the insect nervous system: A ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). J Zool Lond 176, 67-86.
- Williams, J.L.D., Boyan, G.S. 2008. Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: axons pioneering the w, x, y, z tracts project onto the primary commissural fascicle of the brain. Arthropod Struct Dev 37, 129-140.
- Wong-Riley, M.T., Liu, Q. 2005. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. Respir Physiol Neurobiol 149, 83-98.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Green, P., Hartenstein, V. 1996. Early neurogenesis in the *Drosophila* brain. J Comp Neurol 370, 313-329.
- Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G.J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V. 1997. Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tlx*, *otd*, *ems* and *btd*. Dev Biol 182, 270-283.
- Zacharias, D., Williams, J.L.D., Meier, T., Reichert, H. 1993. Neurogenesis in the insect brain: cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. Development 118, 941-955.
- Zak, N.B., Wides, R.J., Schejter, E.D., Raz, E., Shilo, B.Z. 1990. Localization of the DER/flb protein in embryos: implications on the faint little ball lethal phenotype. Development 109, 865-874.

Anlagen

Anlage I

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den
(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- ☐ dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- ☐ dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ☐ dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach und in den Nebenfächern bei der Fakultät für der
(Hochschule/Universität)
unterzogen habe.
- ☐ dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den.....
(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen

Anlage II

Danksagung

Danksagung

Es gibt so viele Menschen, denen ich meinen Dank aussprechen möchte, dass ich nicht weiß, bei wem anfangen.

Herr Prof. Dr. George Boyan, Ihnen gilt natürlich mein besonderer Dank. Nicht zuletzt für das Thema, das Zurverfügungstellen aller technischen Voraussetzungen und die unermüdliche Motivation, Beratung und fachliche Führung. Ihre weltweiten Verbindungen zu Arbeitsgruppen haben mir einen fruchtbaren und bereichernden wissenschaftlichen Austausch erlaubt.

Auch Herrn Dr. Lez Williams und Frau Dr. Zsófia Herbert danke ich herzlich für die Beratung und bedingungslose Unterstützung bei allen anfallenden Arbeiten und Fragestellungen, Sie haben meine wissenschaftliche Denkweise und meine Experimente entscheidend geprägt.

Mit Rat und Tat stand mir Frau Karin Fischer, technische Assistentin, zur Seite, dafür ein herzliches Dankeschön.

Folgenden Herren danke ich für das Zurverfügungstellen von Antikörpern: Dr. C.S. Goodman, Dr. H. Agricola, Dr. M. Eckert, Dr. D. Sánchez, Dr. E. Ball, Dr. M. Bastiani. In der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. H. Reichert in Basel wurde die Elektronenmikroskopie durchgeführt, im Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (aktuell: HelmholtzZentrum München) die Massenspektrometrie. Den betreffenden Arbeitsgruppen danke ich für die Zurverfügungstellung des technischen Equipments und für deren wissenschaftlichen Beistand.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung meiner Doktorandenstelle und der Experimente.

Frau Lieselotte Hertrich danke ich sehr herzlich für ihre gründlichen Korrekturen und ihre große Unterstützung bei der Formatierung dieser Dissertation.

Meinen Lektoren Frau Dr. Uta Strehle und Herrn Dr. Steffen Beisswanger tausend Dank fürs Korrekturlesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Jürgen Glombig, der mir bei persönlichen Tiefpunkten immer zur Seite stand und der immer einen Weg fand, mich aufs Neue zu motivieren. Ohne ihn, wäre mir der Abschluss meiner Dissertation nicht gelungen.

Gedankt sei auch Herrn Werner Albertshofer, der mir immer die nötige Freizeit genehmigte und Hard- und Software für Recherchen für diese Dissertation zur Verfügung stellte.

Immer standen mir meine Freundinnen Marion und Petra Huber, Martina Lima und mein bester Freund Horst Böttcher in schwierigen Zeiten zur Seite. Euch ein herzliches Dankeschön.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meine Eltern. Sie haben mit ihrer elterlichen Liebe meinen kompletten Bildungsweg tatkräftig begleitet und mir somit diese Promotion ermöglicht.

Allen großen und kleinen Helfern, die hier nicht namentlich genannt sind, sie mögen mir dies verzeihen, danke ich im Besonderen, denn oft waren sie es, die mit Gesten oder ein paar Worten mir wieder Kraft und Zuversicht zum Weitermachen gaben.

Anlage III

Eigene Veröffentlichungen

Eigene Veröffentlichungen

(bereits veröffentlichte Ergebnisse der Dissertation)

Die im Folgenden genannten Veröffentlichungen sind dieser Arbeit beigelegt.

Boyan, G., Posser, S., Ludwig, P., Güntner, M., Williams, L. 2004. Ontogeny of identified cells from the median domain in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 33, 125-137.

Williams, J.L.D., Güntner, M., Boyan, G.S. 2005. Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: temporal topology organizes the neuroarchitecture of the *w*, *x*, *y*, *z* tracts. *Arthropod Struct Dev* 34, 97-110.

Herbert, Z., Rauser, S., Williams, L., Kapan, N., Güntner, M., Walch, A., Boyan, G. 2010. Developmental Expression of Neuromodulators in the Central Complex of the Grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Morphol* 271, 1509-1526.

Poster: Sixth Meeting of the German Neuroscience Society. 30th Göttingen Neurobiology Conference. 2005.

M. Güntner and G. Boyan: Embryonic development of the sensory innervation of the antenna in the grasshopper *Schistocerca gregaria*: molecular expression domains and stepping stone pattern of pioneering confirms its appendicular nature.

Die Durchführung der Experimente und die Doktorandenstelle wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (BO 1434/1-2, 1434/1-3, 1434/1-4, 1434/3-5).

Ontogeny of identified cells from the median domain in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*

George Boyan*, Susanne Posser, Peter Ludwig, Michaela Güntner, Lez Williams

Developmental Neurobiology Group, Department of Biology II, Ludwig-Maximilians-Universität, Luisenstrasse 14, 80333 Munich, Germany

Received 24 November 2003; accepted 19 January 2004

Abstract

In this paper, we propose an ontogeny for previously identified cells from the median domain in the midline of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. The so-called lateral cells (LCs) are characteristically located laterally within the median domain at its border with the protocerebral hemispheres. The LC occurs singly and can be identified in the early embryo on the basis of their expression of the cell surface lipocalin Lazarillo. Using immunocytochemical, dye injection, electron microscopical and histological methods, we show that these LC are neurons and derive as postmitotic cells directly from the epithelium of the median domain. Further, they and the other identified cells of the median domain such as the protocerebral commissure pioneers (PCP), co-express the Mes-3 antigen, consistent with a derivation from the mesectodermal germ layer of the embryo. Subsequent to axogenesis, electron microscopy reveals that these Mes-3-expressing LC fasciculate with the co-expressing PCPs within the developing protocerebral commissure. We present a model for the origin of all these cells based on histological data and bromodeoxyuridine incorporation. The model suggests a delamination of cells from the mesectoderm followed by a migration to their ultimate sites within the median domain.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Insect; Embryo; Brain; Median domain; Lateral cells; Immunocytochemistry; Development

1. Introduction

Among the spectrum of approaches being used to study the structure and function of the insect brain, ontogeny is playing an ever more important role. Thus, at the molecular level, the regulation of brain patterning by head gap genes or genes of the Hox complex is becoming increasingly well

understood (Hirth et al., 1995, 1998, 2001; Therianos et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1997; Hartmann and Reichert, 1998; Leuzinger et al., 1998; Reichert and Simeone, 1999), and interspecifically conserved genetic mechanisms are being identified (see Hirth and Reichert, 1999; Reichert, 2002; Sprecher and Reichert, 2003 for reviews). Genetic and lineage analyses using enhancer trap lines, or mutant analyses, have revealed that major brain structures such as the mushroom bodies and central complex involved in learning and memory, and locomotory behaviour, respectively, are anatomically organized along clonal lines (Ito et al., 1997; Tettamanti et al., 1997; Renn et al., 1999; Strauss, 2002). The molecular mechanisms revealed by these studies as being active during early embryonic development regulate the distribution and behaviour of the stem cells of the brain—namely the neuroblasts (Prokop and Technau, 1994; Urbach and Technau, 2003; Urbach et al., 2003). A knowledge of the distribution and regulation of the neuroblasts which generate the neurons that ultimately build the brain is therefore fundamental to any understanding of brain development (see Reichert and Boyan, 1997).

Neuroblast maps have now appeared for the embryonic

Abbreviations: a, Anterior; aFG, Anlage of the frontal ganglion; bm, Basement membrane; BrdU, Bromodeoxyuridine; CNS, Central nervous system; Cy-3, Cytochrome 3 fluorochrome; d, Dorsal; DAB, Diaminobenzidine; DC, Deutocerebrum; DiI, 1,1'-Diiodo-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; FCS, Fetal calf serum; FG, Frontal ganglion; FITC, Fluorescein isothiocyanate; GPI, Glycosylphosphatidylinositol; HRP, Horseradish peroxidase; LC, Lateral cell; LuY, Lucifer yellow dye; Mab, Monoclonal antibody; MD, Median domain; MEc, Mesectoderm; MP, Midline precursor; MPp, Progeny of the midline precursor; NB1,2,3, Neuroblasts 1,2,3; NEc, Neuroectoderm; NGS, Normal goat serum; nuc, Nucleus; PBS, Phosphate-buffered saline; PC, Protocerebrum; PCC, Protocerebral commissure; PCP, Protocerebral commissure pioneer; PO, Peroxidase; SCN, Secondary commissure neuron; stom, Stomodaeum; T1, Prothoracic neuromere of the ventral nerve cord; TRITC, Tetramethyl rhodamine isothiocyanate; v, Ventral.

* Corresponding author. Tel.: +49-89-5902-491; fax: +49-89-5902-450.

E-mail address: george.boyan@lmu.de (G. Boyan).

brains of a variety of insects (grasshopper: Zacharias et al., 1993; *Drosophila*: Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003; stick insect and cockroach: Malzacher, 1968; see Urbach and Technau, 2003 for other insects), and are being used to analyze the development of neuroanatomically highly organized structures such as the central complex (Boyan and Williams, 1997). These neuroblasts are commonly considered to derive from the neuroectoderm (NEc) in both the brain (see Sprecher and Reichert, 2003 for a review) and ventral nerve cord (Bate, 1976; Bate and Grunewald, 1981; Doe and Goodman, 1985). However, not all cells that ultimately contribute to the central nervous system (CNS) originate from this germ layer. Another germ layer, namely the mesectoderm (MEc) located in the exact ganglionic midline, has been reported to generate progenitor cells (Goodman and Doe, 1994; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997) and glia (Sonnenfeld and Jacobs, 1994) in the insect ventral nerve cord. This midline region is known as the median domain (MD) (Dumstrei et al., 1998) and the progenitor cells, termed midline precursors (MPs), are responsible for a range of identified neurons of the CNS of the grasshopper (Bate and Grunewald, 1981; Goodman and Bate, 1981; Goodman, 1982; Kuwada and Goodman, 1985; Goodman and Doe, 1994; Ludwig et al., 1999). Disruption of mesectodermal cell lineages in the *single-minded Drosophila* mutant results in a collapse of the longitudinal tracts throughout the CNS (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988; Nambu et al., 1990, 1991; Sonnenfeld and Jacobs, 1994).

In the brain, the MD of *Drosophila* has been shown to specifically express an epidermal growth factor receptor homolog (*Egfr*), which is required for the differentiation and maintenance of precursor cells within it (Dumstrei et al., 1998), but no single cell analysis of this region has been undertaken. In the equivalent region of the grasshopper brain, we have identified a range of cells using bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation, intracellular dye filling and immunocytochemical methods (Boyan et al., 1995a; Graf et al., 2000; Ludwig et al., 1999, 2001, 2002). We found, for example, that a midline progenitor cell first present at about 25% of embryogenesis generates a lineage of six progeny before dying at about 47% of embryogenesis (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002). These progeny develop into descending interneurons of the adult CNS (Ludwig et al., 2001). We also identified the protocerebral commissure pioneers (PCP) which project the first axons across the brain midline to form the primary fascicle of the protocerebral commissure (PCC) (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999, 2001); and, two other cells in the dorsal MD of the brain midline termed the lateral cells (LCs) (Graf et al., 2000).

The LCs appear in the MD between 27 and 29% of embryogenesis and are characteristically located on each side at its border with the respective protocerebral hemisphere. The LCs can be readily identified by their expression of the GPI-linked cell surface lipocalin Lazarillo, an

expression which coincides with axogenesis in these cells (Sánchez et al., 1995; Ganfornina et al., 1995; Graf et al., 2000). Unclear is, where these cells originate, and whether they carry a mesectodermal identity, as would be expected if the MD itself has a mesectodermal ontogeny. Indeed, the other identified cells such as the PCP and the MP with its progeny might also be expected to demonstrate a mesectodermal identity at the molecular level.

In their studies of midline cells in the ventral nerve cord of the grasshopper, Kotrla and Goodman (1984) generated a monoclonal antibody (Mab) against a cell surface antigen termed Mes-3. Kotrla and Goodman (1984) and Kuwada and Goodman (1985), showed that this antibody specifically labels a subset of neurons in the ventral nerve cord of the grasshopper embryo including the two MP3 progeny. The MPs, in turn, are known to derive from the MEc (Goodman and Doe, 1994). The cell-surface Mes-3 antigen is also expressed by non-neuronal embryonic cells of mesodermal origin such as muscle pioneers (Kuwada and Goodman, 1985). We therefore decided to investigate the ontogeny of the LCs for evidence of their mesectodermal origin using immunocytochemical, dye injection, electron microscopical and histological methods. Our evidence from lineage tracers and dye coupling suggests that these cells derive directly from the epithelium of the median domain, without a defined precursor. They and the other identified cells of the MD such as the PCP, express the Mes-3 antigen, consistent with a derivation from the MEc. Further, we find that these Mes-3 expressing cells fasciculate together within the developing PCC. Finally, we present a model for the origin of these cells which suggests a delamination from the MEc followed by a migration to their ultimate sites of differentiation within the MD.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Schistocerca gregaria eggs were incubated in moist aerated containers at 30 °C. Embryos were staged at time intervals equal to percentage of embryogenesis according to Bentley et al. (1979). All experiments were performed strictly according to the guidelines established by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

2.2. Immunocytochemistry

Staged embryos were dissected out of the egg, freed from embryonic membranes and yolk, washed in 0.2 M phosphate-buffered saline (PBS) (2.1 mM NaH₂PO₄, 15 mM Na₂HPO₄, 175 mM NaCl, pH 7.4) and fixed in Pipes-FA (100 mM Pipes, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% paraformaldehyde, pH 7.4) for 60 min. Preincubation was for 60 min in PBT (0.2 M PBS containing 0.1% Triton X-100) or 5% FCS and 0.1% Tween 20 in 0.2 M PBS.

Neuron-specific anti-HRP primary antibody (Jackson ImmunoResearch) was diluted 1:200 in incubating solution for both single and double staining experiments. The primary antibody against the GPI-linked cell surface lipocalin Lazarillo (Mab 10E6) was diluted 1:2 for single staining and 1:3 for double staining experiments. For anti-HRP/anti-Lazarillo double staining experiments, incubation with primary antibody was for 3 days, while for anti-Lazarillo and anti-HRP immunocytochemistry it was for 5 days, all at 4 °C. The Mab 8B7 recognizes an axon-specific intracellular antigen (Seeger et al., 1993). The 8B7 primary antibody was diluted 1:200 and incubation was for 48 h at 4 °C. The Mes-3 antibody was diluted 1:3 and incubation was for 3 days at 4 °C. For double staining experiments with Mes-3 and HRP, the primary antibodies were diluted 1:3 (Mes-3) and 1:200 (HRP) and incubation was for 3 days at 4 °C. Embryos were then washed in 0.2 M PBS (for anti-HRP/anti-Lazarillo, anti-Mes-3/anti-HRP doublestaining) or 0.1% PBT (for anti-Lazarillo and anti-HRP single staining).

Fluorescein- (goat anti-mouse and goat anti-rabbit FITC, Jackson ImmunoResearch), Rhodamine- (goat anti-rabbit TRITC, Sigma) and Cy3- (goat anti-mouse) conjugated secondary antibodies were employed. Incubation with secondary antibody was for 3 h at room temperature for anti-Lazarillo (GAM-FITC, 1:200 dilution in preincubation solution), for 12 h at 4 °C for anti-Mes-3 (GAM-Cy3, 1:300 dilution in preincubation solution), for 48 h at 4 °C for anti-8B7 (GAM-FITC, 1:300 dilution in preincubation solution), for 48 h at 4 °C for anti-Mes3/anti-HRP double staining (GAM-Cy3 and GAR-FITC each diluted 1:300 in preincubation solution), for 3 days at 4 °C for anti-HRP/anti-Lazarillo double staining (GAM-FITC and GAR-TRITC, each 1:200 in preincubation solution), and for 4 days at 4 °C for anti-HRP (GAR-FITC, 1:200 dilution in preincubation solution). Thereafter, the embryos were washed for 1 h in 0.2 M PBS, cleared in glycerol for at least 3 h and embedded in Vectashield® (Vector laboratories) or Slowfade™ Antifade (MPE, Leiden). Alternatively, after incubation with anti-HRP primary antibody and washing, embryos were incubated with a peroxidase (PO) conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch) for 3 days at 4 °C. These embryos were washed in PBS for 1 h and stained with diaminobenzidine (DAB) using standard protocols, with the addition of 0.075% ammonium nickel sulphate for PO signal intensification (see Boyan and Williams, 2002).

Selected DAB-stained embryos from all experiments were subsequently embedded in soft Epon and sectioned at 20 µm.

2.3. Bromodeoxyuridine incorporation

The method employed was identical to that previously described by Ludwig et al. (1999).

2.4. Brain slices

Embryos were dissected out of the egg in PBS and fixed in Pipes-FA for 30 min. Preparations were then washed in PBS (pH 7.4) for 1 h. A 4% agarose (Sigma, A 0169, Typ I-A) solution in PBS was made up by heating in a microwave. Embedding of the specimens was performed at 50 °C and subsequently the agarose blocks were cooled to allow further jelling. After trimming and mounting, 30–100 µm thick sections were cut on a vibratome (Technical Products International, series 1000, St Louis, MO). The sections were held in PBS for intracellular dye injection or immunocytochemistry.

2.5. Dye injection

2.5.1. Lucifer yellow

Wholemount embryos were prepared as described by Boyan et al. (1995a). Cells were impaled with low resistance (10–20 MΩ) thin walled glass micropipettes and filled iontophoretically with 2% lucifer yellow (LuY) dye dissolved in 2 M lithium acetate using constant hyperpolarizing current for 5 min. Following fixation (30 min in PIPES-FA) and washing (PBS), tissues were preincubated (0.4% PBT, 5% FCS) and exposed to PO conjugated anti-lucifer antibody (Molecular Probes, dilution 1:50) for 12 h at 4 °C. After washing in PBS the tissue was stained with DAB as above.

2.5.2. DiI

Wholemount embryos were laid dorsal side up on a Silgard® covered glass slide and held in place with fine entomological pins. Alternatively, agarose brain sections (70 µm thick) floating in PBS were placed singly on a glass slide, the fluid drained in order to achieve adhesion to the substrate, and then covered in PBS to prevent dessication. For staining with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Molecular Probes), low resistance (10–20 MΩ) thin walled glass micropipettes were filled with a solution of 0.5% DiI in dimethylformamide (DMF). The electrode tip was then brought into contact with the membrane of the target cell under visual control using a ×50 Leitz water immersion objective mounted on a fixed stage Zeiss compound microscope. A controlled flow of dye across the cell membrane into the cell was generated by applying a small depolarizing current to the electrode. Immediately after injection, the embryos were fixed for 45 min in 3.7% formaldehyde in PBS, washed thoroughly, and then placed in 90% glycerol for viewing.

2.6. Histology

The Wigglesworth osmium tetroxide-ethyl gallate

method employed here was as described by Boyan et al. (1993). The tissue was dehydrated through an ascending ethanol series to propylene oxide and embedded in soft Epon. 14 μm thick sections were cut on a rotary microtome and mounted in Permount.

2.7. Electron microscopy

Electron microscopy of dye injected cells was carried out according to Sandell and Masland (1988). Briefly, cells were impaled with micropipettes under visual control as described above, LuY dye was injected iontophoretically, and photoconversion of stained cells was via exposure to a focussed epifluorescent UV-beam through the microscope objective in the presence of DAB. Preparations were subsequently fixed as for conventional electron microscopy (see Meier et al., 1993).

2.8. Imaging

Optical sections of wholemount embryos were acquired with a Leica TCS SP confocal laser-scanning microscope equipped with a dry PL FLUOTAR 20/0.5NA objective lens. Fluorochromes were visualized using an argon laser with excitation wavelengths of 488 nm (for FITC) and 514 nm (for TRITC, Cy-3). To visualize double stainings, red/green filters and different light intensity combinations were used. Confocal images were processed using public domain software (ImageJ). Histological sections of the brain were viewed under a Zeiss microscope, the images digitized with a CCD chip video camera connected to a frame grabber card (Scion Corp.), and processed using public domain software (Image-SXM).

2.9. Neuraxes

The axes used for neuroanatomical analysis in this study are neuraxes, not body axes (see Boyan et al., 1993). Accordingly, the top of the brain (in the head) is neurally anterior, the front of the brain is neurally ventral, the back of the brain is neurally dorsal, and the base of the brain is neurally posterior. Planes of sections are also named with respect to the neuraxis, not the body axis.

3. Results

3.1. Identified cells of the dorsal median domain in the early embryonic grasshopper brain

The MD of the brain is located in the exact midline, anterior to the foregut, and between each of the protocerebral hemispheres (Fig. 1A). Prior to 25% of embryogenesis, the MD consists of an anterior to posterior running stripe of largely undifferentiated epithelial cells which are delimited from the NEC of the brain hemispheres on either

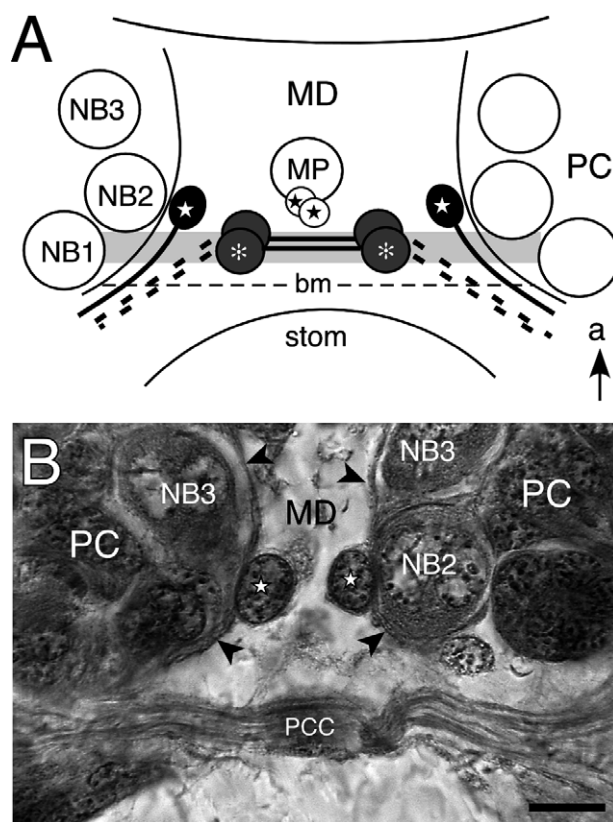


Fig. 1. Identified cells of the dorsal median domain in the early embryonic grasshopper brain. (A) Schematic representation (not to scale) of the preoral brain midline at about 33% of embryogenesis details the location of identified cells of the median domain (MD) as revealed by Wigglesworth histology (see below). Three identified neuroblasts (NB 1,2,3) in each protocerebral hemisphere (PC) bordering the median domain are also shown. Identified cells are the midline precursor (MP) and two of its progeny (black stars); the bilaterally paired protocerebral commissure pioneers (PCP) (white asterisks) which direct the initial axons across the midline and thereby pioneer the protocerebral commissure (grey); and the bilaterally symmetrical lateral cells (white stars) characteristically located at the border of the median domain and protocerebrum at the level of NB2. The lateral cells are not paired, and do not project axons across the midline, but lie laterally along the border of the protocerebrum. The PCP cells subsequently project axons (dashed lines) posteriorly into the ventral nerve cord. The location of the basement membrane (bm, thin dashed line) and the anterior part of the stomodeum (stom) bordering the median domain are also shown. (B) Photomicrograph of a section of the brain at 34% of embryogenesis shows the somata of the lateral cells (white stars) in the dorsal median domain (MD) at each border (black arrowheads) with the protocerebrum (PC). Axons of the protocerebral commissure (PCC) are seen further posterior. Arrow indicates anterior (a). Scale bar (B only) represents 15 μm .

side by a glial border expressing the glia-specific antigen REGA-1 (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999). Studies in both *Drosophila* (Dumstreit et al., 1998) and grasshopper (Ludwig et al., 1999, 2001) propose a mesectodermal origin for the MD. Our aim in this paper is to provide evidence supporting this proposal at the level of single identified neurons.

The MD in the grasshopper has been shown to comprise two proliferative subdomains which differ according to the

mitotic axis of the cell somata in each (Ludwig et al., 1999). The cells in each domain undergo different fates: those in the ventral MD differentiate into peripheral sensory structures such as the median ocellus (see Mobbs, 1976; Goodman, 1981), while cells from the dorsal MD differentiate into various types of interneurons (Ludwig et al., 2001; Boyan et al., 2003). To date, three sets of interneurons have been identified from the dorsal MD.

- (a) The MP and its progeny. The MP lives to 47% of embryogenesis and its six progeny develop into interneurons which project axons into the ventral nerve cord (Ludwig et al., 1999, 2002).
- (b) The bilaterally paired PCPs. These pioneer the primary brain commissure, project axons the entire length of the ventral nerve cord and then develop into neurosecretory cells (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002; Boyan et al., 2003). The PCPs are readily identifiable in that they uniquely express the Term-1 antigen in the embryonic nervous system (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999, 2001).
- (c) The unpaired LCs. These cells do not project axons across the brain midline but laterally along the border of the protocerebrum (PC) and then posteriorly at least into the deutocerebrum (DC) (Fig. 1A and B; Ludwig et al., 1999, 2001; Graf et al., 2000; Boyan et al., 2003). The LCs can be readily observed in histological sections occupying stereotypic positions in the MD at the level of protocerebral neuroblast 2 (Fig. 1B), and are the focus of this study.

3.2. Immunocytochemical characterization of the lateral cells of the median domain

The LCs were first identified by intracellular dye injection in the early embryo (Boyan et al., 1995a). Double immunolabelling with antibodies against HRP and Mes-3 shows that these neurons are present at 27% of embryogenesis (see Fig. 5A). At 31% of embryogenesis their somata and axons clearly co-express the Mes-3 antigen (Fig. 2A). The somata of the LCs are seen in their stereotypic positions in the dorsal MD, anterior to those of the PCP. The PCP cells have at this stage pioneered the first fascicle of the PCC. The PCP cells co-express HRP and Mes-3, but here the HRP expression is the stronger. The fact that all these cells express the neuron-specific HRP antigen (see also Ludwig et al., 1999) is evidence for their being neurons and confirms our previous findings.

The LCs have been previously shown to uniquely express the GPI-linked lipocalin Lazarillo on their cell surfaces in the early embryonic MD (Graf et al., 2000). Double immunolabelling with antibodies against HRP and Lazarillo here (Fig. 2B) confirms this finding. Our double labelling data show that these cells do not have postmitotic siblings and that their axons project laterally from the dorsal MD

into the PCC and do not cross the brain midline (Fig. 2B). The question of which neurons they then fasciculate with is examined below. HRP immunocytochemistry reveals that by 36% of embryogenesis (Fig. 2C), the axons of the LC on each side have turned posteriorly and their filopodia are in the process of fasciculating with the growth cones of cells ascending from the DC. The LCs therefore contribute to the primary axon scaffold of the embryonic brain (see also Graf et al., 2000).

A 3D reconstruction from serial confocal images following HRP immunocytochemistry at 38% of embryogenesis (Fig. 2D and E) shows that the PCC has expanded considerably. The LCs lie in the same plane as the commissure, project axons into the commissure, and these axons run in a dorsal fascicle of the commissure. Double immunolabelling with antibodies against HRP and Lazarillo at 38% of embryogenesis (Fig. 2F) reveals a co-expression of both antigens in the LCs, and further, that the axons of the LCs appear confluent with axons comprising a single co-expressing fascicle within the PCC. When viewed with only one TRITC filter to single out Lazarillo expression (Fig. 2G), this preparation reveals a co-fasciculation between Lazarillo-expressing axons in the commissure and the axons of the LCs. The identity of these axons is unclear, but, immunostaining against the axon-specific intracellular antigen 8B7 at 39% of embryogenesis shows (Fig. 2H) that the LCs are not confluent with the axons of the secondary commissure neurons (SCN) which clearly run in a separate fascicle of the commissure.

3.3. Fasciculation of identified axons from the primary fascicle of the protocerebral commissure

One method to identify axons fasciculating with one another is via immunoelectronmicroscopy. This method provided inconclusive data in our hands. Since all neurons of the MD are readily identifiable optically in the early embryo (30–35%), we chose intracellular injection of LuY dye followed by photoconversion of the dye to an electron dense product in the presence of DAB and subsequent electron microscopy as our preferred method for demonstrating fasciculation. We chose the LCs on one side of the MD, and the sibling primary commissure pioneers (PCP) on the contralateral side (the ones which direct axons back across the midline towards our impaled LC) as candidates for fasciculation (Fig. 3, inset). Using semithin sections to first reconstruct the axon trajectories, we can show via electron microscopy (Fig. 3) that the axons of all three injected cells lie within the PCC, and that the axon of the impaled LC clearly fasciculates with an axon from one of the two impaled PCP cells. The axon of the LC fasciculates with the pioneer of the PCC. Both these cells are shown below to co-express the cell surface Mes-3 antigen, consistent with a derivation from the MEc of the embryo.

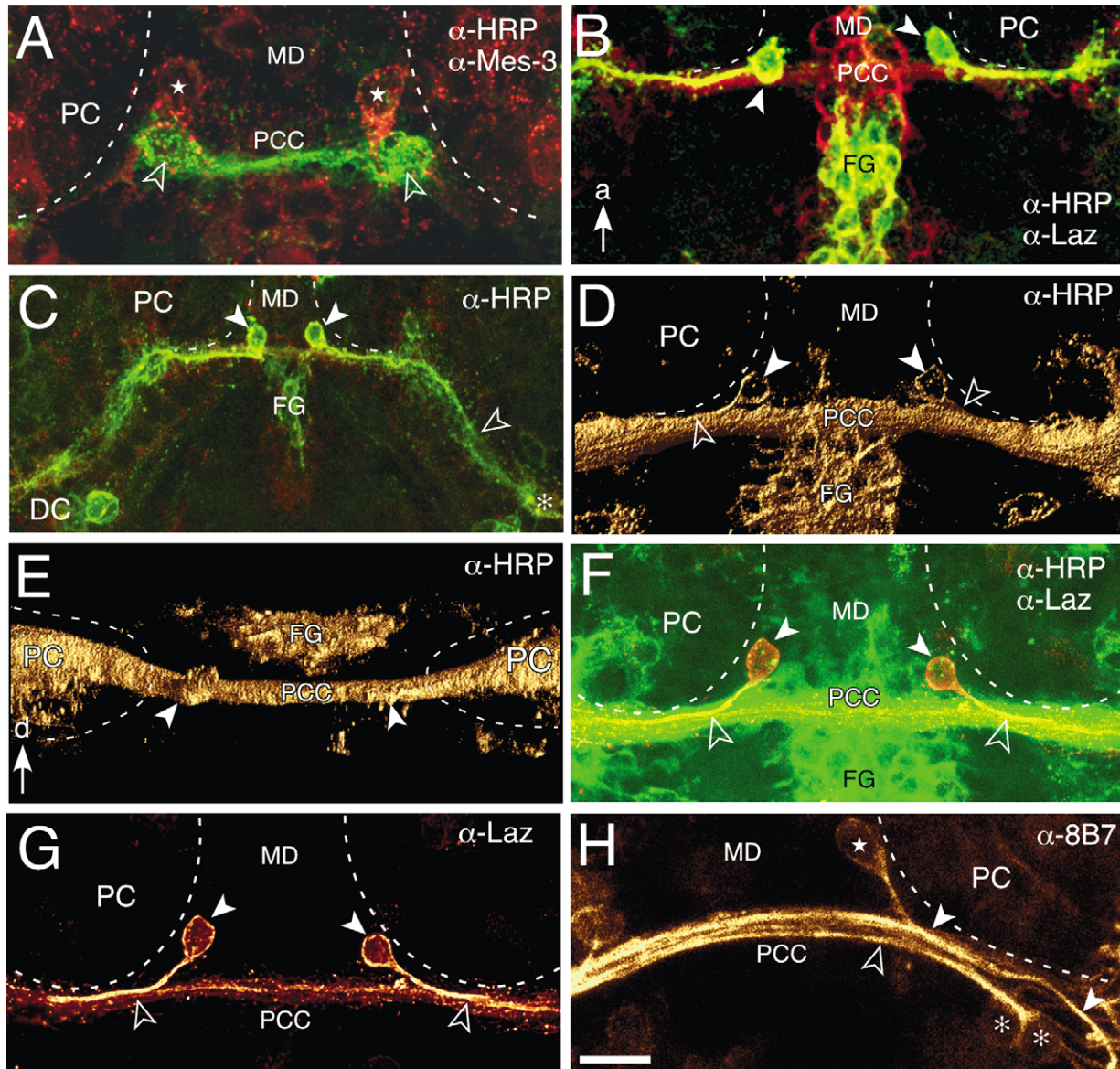


Fig. 2. Immunocytochemical characterization of the lateral cells of the median domain. (A) Confocal image of the median domain at 31% of embryogenesis following double immunolabelling with antibodies against HRP (green) and Mes-3 (red). Staining reveals the somata (white stars) of the lateral cells (LC) express the Mes-3 antigen. The bilateral PCP neurons (open white arrowheads) strongly express the HRP antigen and weakly the Mes-3 antigen. The PCP cells have at this stage pioneered the first fascicle of the protocerebral commissure (PCC). (B) Confocal image of the median domain at 33% of embryogenesis following double immunolabelling with antibodies against HRP (red) and Lazarillo (green). Co-expression is indicated by yellow. The somata (white arrowheads) and axons of the lateral cells clearly express both antigens, and are the only cells in this brain region to do so. Note that the axons project laterally along the border of the PC and not across the midline. Cells from within the placode which migrates posteriorly to form the frontal ganglion (FG) also co-express HRP and Lazarillo. Arrow indicates anterior, a, here and in all other figures except 'E'. (C) Confocal image at 36% of embryogenesis following HRP immunocytochemistry reveals the lateral cells (white arrowheads) and their axons expressing the antigen (green). Note that the axons have turned posteriorly and the filopodia of one (open white arrowhead) are in the process of fasciculating with the processes of cells (white asterisk) ascending from the deutocerebrum. (D) 3D reconstruction from serial confocal images following HRP immunocytochemistry, viewed from dorsal, at 38% of embryogenesis. The lateral cells (white arrowheads) project axons (open white arrowheads) into the protocerebral commissure (PCC). False colour image. (E) As for 'D' but the preparation has been rotated by 90° about the X-axis and is now viewed from anterior (i.e. from above). The somata of the lateral cells (white arrowheads) lie in the same dorso-ventral plane as the PCC, and ventral to the developing frontal ganglion (FG). Arrow indicates dorsal, d. (F) Confocal image of the median domain at 38% of embryogenesis following double immunolabelling with antibodies against HRP (green) and Lazarillo (red/orange). Co-expression is indicated by yellow. The lateral cells (white arrowheads) are seen to co-express both antigens, and their axons (open white arrowheads) project into the PCC where they appear confluent with a co-expressing fascicle. (G) The same preparation as in 'F' but now viewed only with the red filter to reveal Lazarillo expression (false colour image). The lateral cells (white arrowheads) are clearly the only cells within the median domain (MD) to express the Lazarillo antigen at this stage and are seen to direct axons into the PCC where they appear to join a specific fascicle (open white arrowheads). (H) Confocal image following immunostaining with the antibody against the axon specific 8B7 antigen at 39% of embryogenesis. The lateral cell (white star) can be seen to direct an axon into the PCC and join a specific co-expressing fascicle (white arrowheads). This fascicle is different to that generated by the axons (open white arrowhead) of the ipsilateral secondary commissure neurons (white asterisks). False colour image. Scale bar in H represents 15 μ m in A, 30 μ m in B, 35 μ m in C, 30 μ m in D, 30 μ m in E, 30 μ m in F, 30 μ m in G, 15 μ m in H.

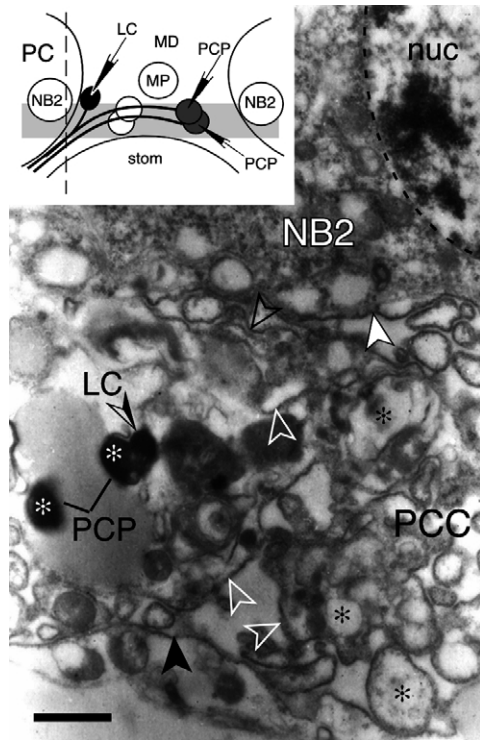


Fig. 3. Electron micrograph of a parasagittal section of the brain at the level indicated by the dashed line in the inset, and following intracellular injection of LuY dye into an ipsilateral lateral cell (LC) and both contralateral PCP cells from the median domain (MD) of the same preparation. Inset shows the recording situation, the location of the future PCC is shaded grey. The injected dye was subsequently photoconverted in the presence of DAB prior to fixation for EM. 35% of embryogenesis. In the micrograph, the stained axon of the LC (black and clear arrowhead) can be seen to fasciculate with a stained axon from one of the PCP cells (white asterisks). The cell membrane of neuroblast NB2 is indicated by a white arrowhead (its nuclear membrane is dashed black); the border of the protocerebrum is indicated by an open black arrowhead; the membrane surrounding the protocerebral commissure (PCC) by open white arrowheads; and the basement membrane by a black arrowhead. Unidentified axons (black asterisks) of the PCC are also visible in the section. The large grey area encompassing the PCP axons is an artefact of intracellular staining, fixation and photoconversion. Scale bar represents 2 μ m.

3.4. Ontogeny of the lateral cells: iontophoretic injection of DiI and lucifer yellow

A major question still to be resolved is the origin of the LCs, the PCPs, and the MP of the MD. One method to establish ontogeny is via iontophoretic dye injection, and here we examine this question with respect to the LCs using two very different dyes.

Iontophoretic application of the established lineage tracer, DiI (see [Bossing and Technau, 1994](#)), to the soma of a LC in a 31% embryo reveals the complete morphology of the cell at this developmental stage (Fig. 4A). Filopodial extensions emanate from the axon and growth cone as it navigates laterally along the border of the PC. More importantly for lineage analysis, we see no dye coupling to any other cells of either the MD or the PC. The fact that only a single cell is ever stained in our experiments suggests that the LC possesses neither a sibling nor a defined

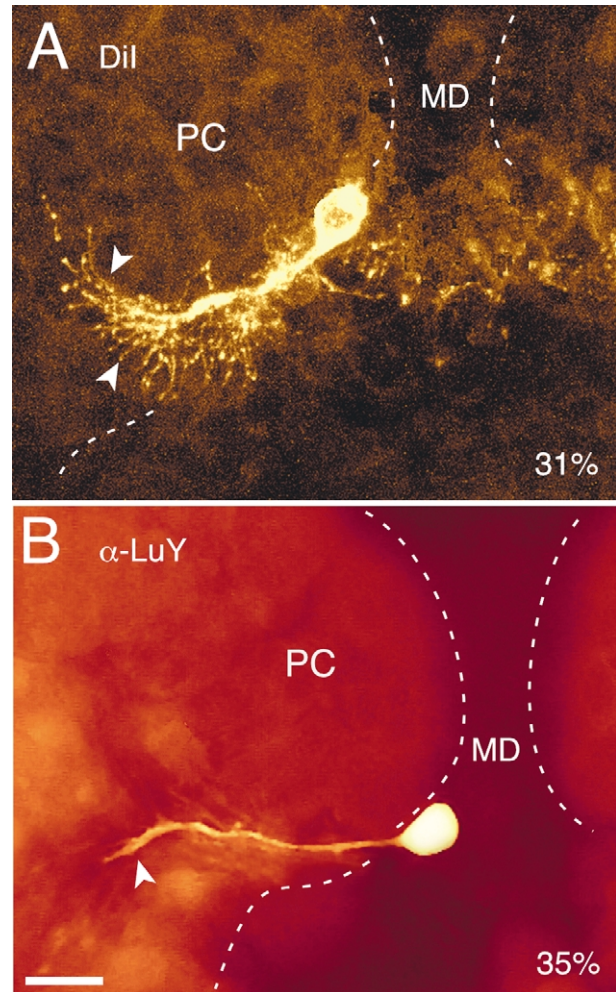


Fig. 4. The lateral cell stained via iontophoretic dye injection. (A) Video image of the brain of a grasshopper at 31% of embryogenesis following application of the dye DiI to the soma of a lateral cell. Staining reveals the complete morphology of this cell. Note the filopodial extensions (white arrowheads) emanating from the growth cone and axon. Note also the lack of dye coupling to any other cells of either the median domain (MD) or protocerebrum (PC). (B) Video image of the brain of a grasshopper at 35% of embryogenesis following intracellular injection of the dye lucifer yellow (LuY) into a lateral cell in a 35% embryo and subsequent anti-LuY immunocytochemistry. Note that no other cells of either median domain or protocerebrum are dye coupled to this lateral cell. Note also the reduction in filopodial extension from the growth cone (white arrowhead) compared to the cell at 31% in 'A' despite the relatively strong staining of the soma and axon. Anterior is to the top in both figures. Scale bar in B represents 15 μ m in A and B.

precursor in the form of a neuroblast or ganglion mother cell.

In contrast to DiI, LuY dye is not a lineage tracer, but has been demonstrated to reveal dye coupling between ontogenetically related cells, presumably via gap junctions, in the embryonic ventral nerve cord ([Goodman and Spitzer, 1979](#)) and MD of the brain ([Ludwig et al., 1999](#)). We thus decided to also apply this method to examine the ontogeny of the LCs. In a 35% embryo (Fig. 4B), the axon has extended laterally, and runs within the PCC. The

morphology is almost identical to that revealed by immunocytochemistry (Fig. 2), but there appears to be a reduction in filopodial extension from the growth cone and axon compared to the cell stained with DiI at 31% (c.f. Fig. 4A). Nevertheless, the results with LuY staining are consistent with those for DiI application in that there is a complete lack of dye coupling to any other cell of the PC or MD.

This failure to reveal a precursor for the LCs at any age tested via two dye staining methods leads us to suggest that the LCs derive directly via invagination from the epithelium of the MD.

3.5. Ontogeny of the lateral cells: immunocytochemical evidence for a mesectodermal origin

The experiments with dye injection above suggest that the LCs derive from the epithelium of the MD. The MD itself has been suggested to be of mesectodermal origin in both *Drosophila* (Dumstrei et al., 1998) and grasshopper (Ludwig et al., 1999). If this is the case, one might expect identified cells of the MD to carry molecular labels associating them with the MEc. The Mes-3 Mab has been shown to specifically label a subset of neurons in the ventral nerve cord of the grasshopper embryo including the two MP3 progeny (Kotrla and Goodman, 1984; Kuwada and Goodman, 1985), and the MPs are known to derive from the MEc (Goodman and Doe, 1994). The cell-surface Mes-3 antigen has also been reported from non-neuronal embryonic cells of mesodermal origin such as muscle pioneers (Kuwada and Goodman, 1985). We decided to examine the LCs and PCPs in the MD for evidence of their mesectodermal origin using the Mes-3 antibody.

Our data provide immunocytochemical evidence for a mesectodermal origin for these cells of the MD (Fig. 5). Double labelling with antibodies against HRP and Mes-3 at 27% of embryogenesis reveals that the LCs have already differentiated at this stage and that they co-express the HRP and Mes-3 antigens on their somata and axons (Figs. 5A and 2). Mes-3 expression in these cells commenced at axogenesis and extended for at least the time window of this study (43%). The PCP neurons, which pioneer the PCC at 31%, also co-express these antigens, as do cells of the Anlage of the frontal ganglion (aFG) (part of the brain-retrocerebral complex). At 33% of embryogenesis (Fig. 5B and C), the LCs and the PCP cells still clearly co-express the HRP and Mes-3 antigens, as do unidentified progeny of the MP. Expression of the cell surface Mes-3 antigen encompasses the complete cell, including the prominent growth cone (Fig. 5C), and remained over all stages tested (up to 43% of embryogenesis). The SCN by contrast, which derive from the protocerebral hemispheres (Boyan et al., 1995a), only express HRP, consistent with a neuroectodermal and not mesectodermal origin.

Along with the Mes-3 expression in the MD, we found a prominent expression in a clearly defined group of cells within each protocerebral hemisphere. Histological examination of this region suggests that these cells putatively

belong to neurosecretory cells of the brain-retrocerebral complex (unpublished observations), consistent with their having a mesectodermal origin.

Outside of the brain, the pattern of Mes-3 expression we found in the ventral nerve cord (Fig. 5D) was consistent with that reported by Kotrla and Goodman (1984) and Kuwada and Goodman (1985). Occurring in a highly metameric pattern, and from the onset of axogenesis, we found expression on the surfaces of MP3 progeny (not shown), on muscle pioneers and on pioneer axons of the intersegmental nerves (Fig. 5D). The confirmatory nature of these results from the thorax gives us confidence as to the reliability of our findings in the MD of the brain (Fig. 5A–C).

3.6. Ontogeny of the lateral cells: cell migration in the dorsal median domain of the early embryonic brain

Our evidence above that the LCs, PCPs, and progeny of the MP, all most probably derive from the epithelium of the MD and are of mesectodermal origin (Figs. 4 and 5), does not answer the question of how they arrive at their stereotypic locations within the dorsal MD.

We previously used the incorporation of BrdU in whole embryo culture to demonstrate the presence of mitotically active cells in the most peripheral region of the MD (Ludwig et al., 1999). When we examined the dorsal subdomain histologically (Fig. 6) we found epithelial cells extending filopodia-like extensions towards the basement membrane (bm) (Fig. 6A). Other cells were appearing to delaminate from this epithelium and then migrate along these filopodia-like extensions (Fig. 6B). Among the cells that were migrating was the large MP (Fig. 6C), the only precursor which forms in this domain (Ludwig et al., 1999). When we repeated the experiments with BrdU incorporation here (not shown) we also found cells, which had incorporated BrdU apparently suspended along the cytoplasmic extensions of other immunoreactive cells in the MD. Our interpretation of these data are summarized schematically in Fig. 6D. We hypothesize that not only the MP, but also the LCs and the PCPs delaminate from the mesectodermal epithelium and then migrate along the cellular extensions of these mesectodermal cells to their respective locations within the dorsal MD. The time window over which we see this apparent migration (27–34% of embryogenesis) covers the period over which the respective identified cells appear at their respective locations in the MD.

4. Discussion

In this paper, we have investigated the ontogeny of identified cells in the so-called MD of the embryonic brain of the grasshopper *S. gregaria*. Located in the exact midline, the MD has been proposed to derive from the mesectodermal germ layer of the embryo and generate neurons for the CNS (Goodman and Doe, 1994; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997). The neurons can be generated directly

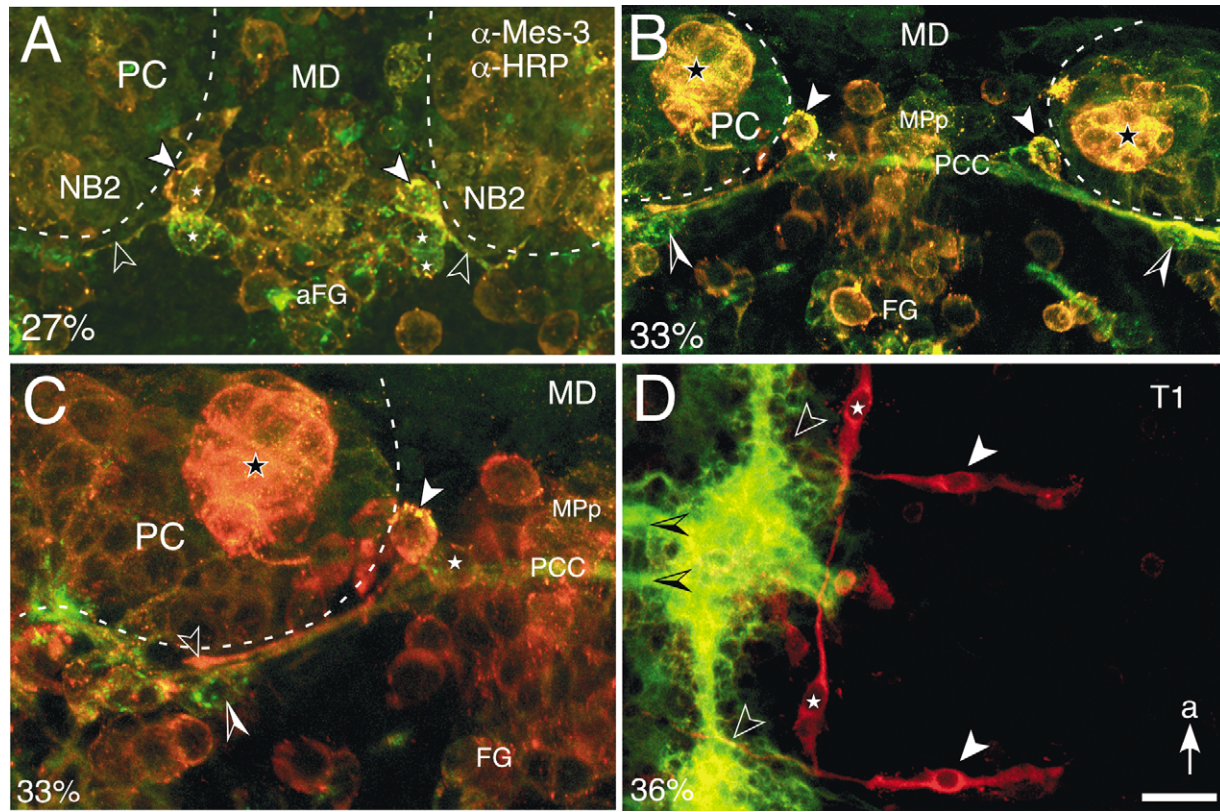


Fig. 5. Immunocytochemical evidence for a mesectodermal origin for identified cells of the median domain. (A) Confocal image of the median domain at 27% of embryogenesis following double staining with antibodies against HRP (green) and Mes-3 (red/orange). Co-expression is indicated by yellow/orange. The lateral cells co-express the HRP and Mes-3 antigens on their somata (white arrowheads) and axons (open white arrowheads). The PCP neurons (white stars) which pioneer the PCC at 31% also co-express these antigens, as do the cells of the Anlage of the frontal ganglion (aFG). (B) At 33% of embryogenesis, confocal image following double staining with antibodies against HRP (green) and Mes-3 (red/orange) shows that the lateral cells (white arrowheads) clearly co-express (yellow) the HRP and Mes-3 antigens, as do the PCP cells (one of which is visible, white star) which have pioneered the PCC. The secondary commissure neurons (SCNs, black and white arrowheads) only express HRP (green) and are not mesectodermal in origin. Note the prominent co-expression (black star) in each protocerebral hemisphere. These cells putatively belong to the brain-retrocerebral complex. (C) Same preparation as in 'B' but at higher magnification and with different filter setting reveals details of the Mes-3 expression (red/orange) in the lateral cells. Co-expression (yellow) of HRP and Mes-3 is obvious on the cell soma of the lateral cell (white arrowhead), while the growth cone (open white arrowhead) is strongly Mes-3 positive. The PCP cell (white star) also co-expresses these antigens, but the secondary commissure neuron only expresses HRP (green). The colour change in C results from using a different filter to visualize the same fluorochromes as in A, B. (D) In the prothoracic neuromere (T1) of the ventral nerve cord, confocal image following double staining with antibodies against HRP (green) and Mes-3 (red/orange) at 36% of embryogenesis shows serially iterated pioneers of the intersegmental nerve expressing the Mes-3 antigen on their cell body (white arrowheads) and axon (open white arrowheads). Longitudinal muscle pioneers (white stars) also express the antigen. The ventral nerve cord, including two commissures within T1 (black/open arrowheads) is visualized via HRP staining. Arrow points to anterior, a, for all parts. Scale bar represents 25 μ m in A, 30 μ m in B, 20 μ m in C, D.

via invagination (delamination), or via precursor cells (see Dumstreit et al., 1998). In the ventral nerve cord, these precursor cells are called MPs and differ from the neuroblasts of the neighboring ganglionic hemispheres in several respects. As mentioned, they derive from the MEC while the neuroblasts derive from the NEC. Next, the MPs generate their progeny directly and singly, and not via symmetrical divisions of intercalated ganglion mother cells (Bate, 1976; Bate and Grunewald, 1981; Kotrla and Goodman, 1984; Kuwada and Goodman, 1985). In this respect, the MPs somewhat resemble the teloblasts of the crustacean CNS (Anderson, 1973). Further distinctions between MPs and neuroblasts appear at the molecular level. In contrast to the median neuroblasts, the MPs do not express the Engrailed protein (Patel et al., 1989), probably

because the precursors are located within the anterior compartment of a given segment. More interestingly for our present study, the progeny of these MPs express the cell surface antigen Mes-3 during early embryogenesis (Kotrla and Goodman, 1984; Kuwada and Goodman, 1985), a protein also found on non-neuronal cells of mesodermal origin such as the muscle pioneers (Kotrla and Goodman, 1984; Fig. 5D).

In the embryonic head of both *Drosophila* and grasshopper, the MD exists as a stripe of tissue extending from the ventral epithelium (according to the neuraxis) to the bm, and is bounded laterally by the protocerebral hemispheres (Figs. 1 and 6; Dumstreit et al., 1998; Ludwig et al., 1999). In *Drosophila* loss-of-function mutants involving the EGFR pathway, parts of the optic lobe, stomatogastric nervous

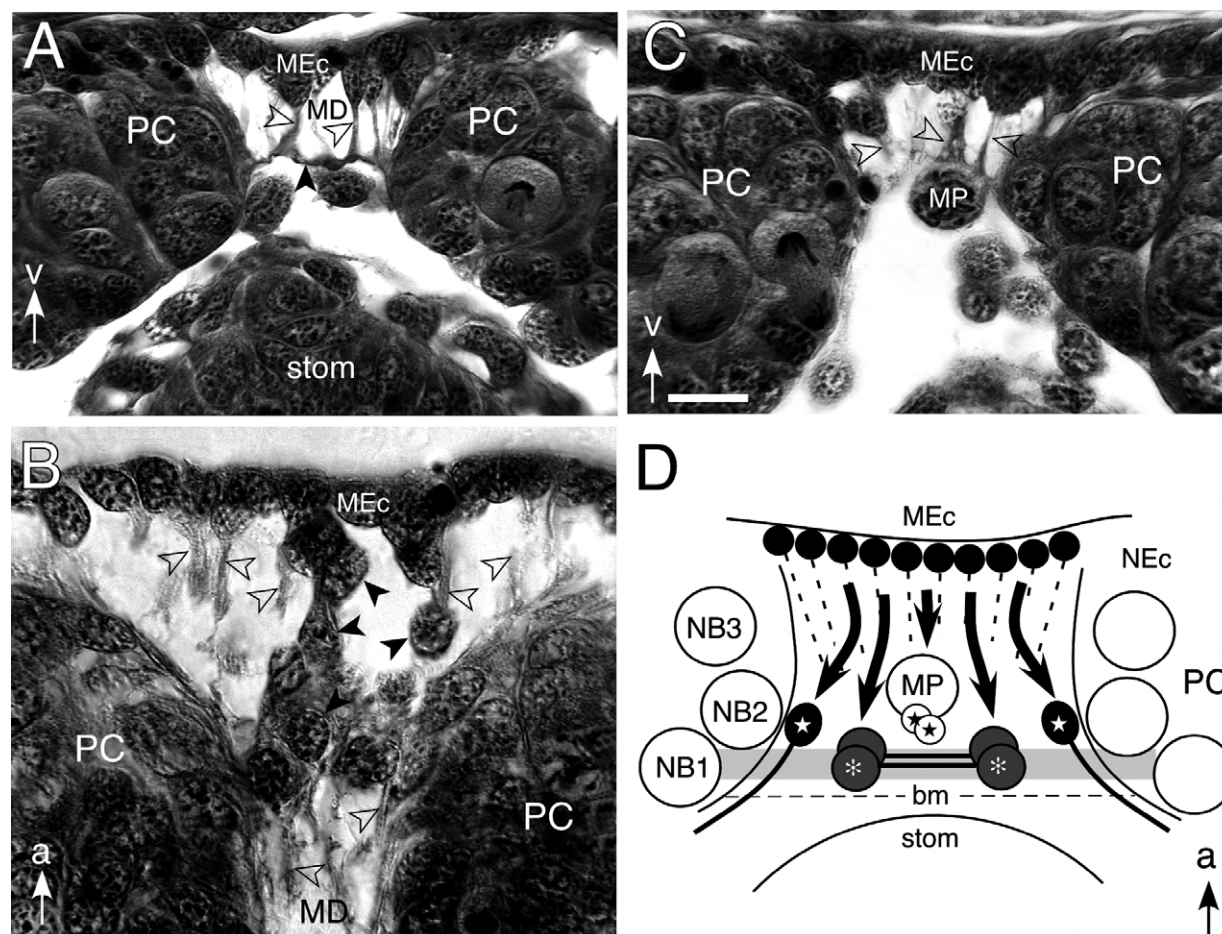


Fig. 6. Cell migration in the dorsal median domain of the early embryonic brain (34%) as revealed by Wigglesworth histology. (A) Photomicrograph of a section through the brain reveals epithelial cells from the mesectoderm (MEc) of the median domain (MD), some of which direct processes (open arrowheads) to the basement membrane (black arrowhead). White arrow points to ventral (v). (B) Photomicrograph of a section through the brain of a different preparation, with a different orientation, and at higher magnification to 'A' above. Visible are the processes (open black arrowheads) of mesectodermal cells, some of which (black arrowheads) have already delaminated from the epithelium en route to posterior regions of the median domain (MD). White arrow points to anterior (a). (C) Photomicrograph of a further brain section, orientation as in 'A', shows the large midline precursor (MP) subtended by processes (open black arrowheads) of mesectodermal cells of the median domain. White arrow points to ventral (v). (D) Summary schematic (not to scale) detailing the proposed origin of the lateral cells (white stars), protocerebral commissure pioneers (white asterisks), and progeny (black stars) of the midline precursor (MP) in the median domain of the brain. We propose that these identified cells delaminate from the most anterior mesectodermal epithelium (MEc) and migrate posteriorly along cellular processes (dashed lines) to their various destinations in the median domain (black arrows). Approximate location of the basement membrane (bm) is indicated. Neighboring neuroblasts (NB 1-3) of the protocerebrum (PC) derive from the neuroectoderm (NEc). Arrow points to anterior, a. Scale bar in C represents 20 μm in A, 15 μm in B, and 20 μm in C.

system and dorsomedial brain fail to develop (Dumstrei et al., 1998). This suggests that the MD may in fact spread out laterally in the brain, and we speculate on the basis of tissue similarity, that at least in the grasshopper, this mesectodermal tissue gives rise not only to the median ocellus but also the lateral ocelli.

The MD of the head in *Drosophila* has been molecularly characterized and found to uniquely express an *Egfr*, which is required for the differentiation and maintenance of precursor cells within it (Dumstrei et al., 1998). These precursor cells have been termed 'head midline cells' and although the exact lineages they generate have not been established, they are known to continuously express the proneural gene *l'sc* over a time window of several hours, in contrast to neuroectodermal neuroblasts which express this

gene only transiently (Dumstrei et al., 1998). Further, the cellular organization of the mesectodermal cells in the midline is fundamental to the correct establishment of the axon scaffold of the CNS. The absence of the *single-minded* gene in the embryonic *Drosophila* brain, for example, causes a gap in the longitudinal array of glial cells between the brain and the ventral nerve cord. This gap cannot be bridged by longitudinal pioneer axons, and as a consequence the circumesophageal connectives fail to form (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988; Nambu et al., 1990, 1991; Sonnenfeld and Jacobs, 1994).

In the grasshopper, we found cells of the MD to be organized into two subdomains according to the orientation of their mitotic axes, and these subdomains also generated different structures in the adult head (Ludwig et al., 1999).

The ventral subdomain gives rise to the median ocellus (see also Mobbs, 1976; Goodman, 1981), while the dorsal domain generates a set of identified neurons discussed in this paper, and a placode of cells which migrates posteriorly to form the frontal ganglion (FG) of the stomatogastric nervous system (c.f. Ganfornina et al., 1996). In this respect, it seems to be similarly organized to that of *Drosophila* as described above. Within the dorsal MD, only one MP differentiates (Ludwig et al., 1999). This cell fails to express the Engrailed protein (Boyan et al., 1995b; Boyan and Williams, 2002), and generates a lineage of six progeny before dying (Ludwig et al., 1999). These progeny develop into descending interneurons whose axons project into the ventral nerve cord via the same pathway as those of the PCPs (Ludwig et al., 1999, 2001, 2002). We also identified two other cell types, which appeared to derive directly from the MEc and not via precursors. The first of these, the bilaterally paired PCPs, uniquely express the Term-1 antigen in the embryonic nervous system (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999) and pioneer the primary fascicle of the interhemispheric PCC (Boyan et al., 1995a; Ludwig et al., 1999, 2001). The PCPs also develop into descending neurons of the CNS (Meier et al., 1993; Ludwig et al., 1999, 2002) and express a Leukokinin-1-like neuropeptide during larval development (Ludwig et al., 2001). This feature identifies them as putative neurosecretory cells, consistent with a mesectodermal ontogeny.

The other identified cells of the MD are the LCs which are characteristically located at both margins of the MD where it borders the protocerebral hemispheres (Fig. 1B). The LCs occur singly and have been identified in the early embryo via intracellular dye injection (Fig. 4; Boyan et al., 1995a), and on the basis of their expression of the GPI-linked cell surface lipocalin Lazarillo (Sánchez et al., 1995; Ganfornina et al., 1995; Graf et al., 2000). Experimental evidence suggests that the LCs must derive via direct delamination from the MEc of the MD. First, incorporation of BrdU reveals that only a single precursor cell differentiates in this region up to 50% of embryogenesis (Ludwig et al., 1999). Intracellular dye injection shows that this MP is only dye coupled to its own progeny and not to the LCs (Ludwig et al., 1999), so that the LCs are not part of the MP lineage. Further, dye injection experiments with the lineage tracer DiI and LuY here (Fig. 4) reveal extensive staining of the somata of the LCs, their neurites, axons, and growth cones, but no dye coupling to other cells of either the MD or the protocerebral hemispheres (Fig. 4). Thus, whereas the progeny of the MP clearly dye couple to their mother cell (Ludwig et al., 1999), an LC does not appear to possess a postmitotic sibling cell or a precursor.

Our immunocytochemical data show, that the LCs express the neuron-specific antigen HRP, and as such are neurons (Fig. 2; see also Ludwig et al., 1999; Graf et al., 2000). They also co-express the Mes-3 antigen (Figs. 1A and 5). The PCP cells also co-express the Mes-3 antigen, as do the progeny of the MP (Fig. 5). In this molecular respect

at least, the cells of the MD in the head are remarkably similar to the progeny of the MPs of the ventral nerve cord described by Kotrla and Goodman (1984) and Kuwada and Goodman (1985), and we propose that the data are consistent with a derivation of all these cells from the mesectodermal germ layer of the embryo.

Subsequent to neurogenesis, immunocytochemistry reveals that these Mes-3-expressing LCs project axons into the primary fascicle of the PCC of the brain (Fig. 2). In order to identify at least some axons with which the LCs fasciculate, we performed intracellular dye injection experiments coupled with photoconversion and electron microscopy (Fig. 3). In this way, we have shown that the LCs fasciculate with the Term-1 and Mes-3 co-expressing PCC pioneer within the developing PCC.

If, as we propose, the LCs, PCP cells and MP delaminate from the mesectodermal epithelium of the MD, there remains the question of where within this domain they delaminate. They could originate exactly at their characteristic locations (see Fig. 1A), or they could migrate to these sites from elsewhere within the domain. Our histological data, including incorporation of BrdU in whole embryo culture (Ludwig et al., 1999), suggest a delamination from the anterior-ventral MEc followed by a migration posteriorly to their ultimate sites of differentiation within the MD along cellular processes of the type reported for epidermal cells in other insects (Locke and Huie, 1981). Such a migration prior to differentiation is seen elsewhere in the embryonic insect nervous system: namely, with the placode of mesectodermal cells that migrates posteriorly from the MD to ultimately form the FG of the stomatogastric nervous system of the grasshopper (Fig. 5; Ganfornina et al., 1996); and, with the migration of cells within the equivalent (enteric) nervous system of *Manduca* (Copenhaver and Taghert, 1989).

It is clear that future experiments must establish the early origin of the MD in the grasshopper brain and also better define the ontogeny of the cells it generates. The injection of lineage tracers into mesectodermal tissue in embryo culture, for example, might reveal what the injected cells give rise to and thereby expand on the essentially negative data (lack of dye coupling between postmitotic and epithelial cells) we present here (Fig. 4). Alternatively, a combined lectin and colloidal gold probe could be tried since this probe has been shown to be incorporated into membrane bound vesicles of MEc precursors and so act as a mesectodermal marker in mammalian embryo culture (Smits van Prooije et al., 1986). Ideally, a molecular approach might reveal an equivalent to the *Drosophila single-minded* gene which regulates mesectodermal lineages in the CNS midline (Sonnenfeld and Jacobs, 1994), or to the gene described by Ng et al. (1989) which is closely related to mammalian GAP-43 and is observed in a metamer pattern in the MEc and presumptive epidermis. Expression of this protein is subsequently restricted to sets of cells that are segmentally

reiterated and may establish the scaffolding for the development of the longitudinal neuropil.

Acknowledgements

We thank Dr M. Bastiani for his generous gift of the Lazarillo antibody, and Dr E. Ball for his generous gift of the Mes-3 antibody. DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, kindly provided free samples of their EnVision™ goat anti-mouse HRP-conjugated polymer. Dr Steve Therianos provided invaluable assistance with electron microscopy. We thank Drs Bolz and Bastmeyer, Jena, for generously allowing us access to their confocal scanning facility. We thank Eva Lodde and Karin Fischer for valuable technical assistance. Grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft (BO 1434/1-3, 1-4).

References

- Anderson, D.T., 1973. Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods, Pergamon Press, Oxford.
- Bate, C.M., 1976. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. Journal of Embryology and Experimental Morphology 35, 107–123.
- Bate, C.M., Grunewald, E.B., 1981. Embryogenesis of an insect nervous system. II. A second class of precursor cells and the origin of intersegmental connectives. Journal of Embryology and Experimental Morphology 61, 317–330.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M., Toroian-Raymond, A., 1979. Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper *Schistocerca nitens*. Journal of Embryology and Experimental Morphology 54, 47–74.
- Bossing, T., Technau, G.M., 1994. The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labelling. Development 120, 1895–1906.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., 1997. Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. Development, Genes and Evolution 207, 317–329.
- Boyan, G., Williams, L., 2002. A single cell analysis of engrailed expression in the early embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: ontogeny and identity of the secondary headspot cells. Arthropod Structure and Development 30, 207–218.
- Boyan, G., Williams, L., Meier, T., 1993. Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. Journal of Comparative Neurology 332, 358–377.
- Boyan, G.S., Therianos, S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1995a. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. Development 121, 75–86.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1995b. Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. Roux's Archives of Developmental Biology 205, 45–53.
- Boyan, G.S., Reichert, H., Hirth, F., 2003. Commissure formation in the embryonic insect brain. Arthropod Structure and Development 32, 61–77.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V., 1997. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*, second ed., Springer, Berlin.
- Copenhaver, P.F., Taghert, P.H., 1989. Development of the enteric nervous system of the moth II. Stereotyped cell migration precedes the differentiation of embryonic neurons. Developmental Biology 131, 85–101.
- Crews, S.T., Thomas, J.B., Goodman, C.S., 1988. The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. Cell 52, 143–151.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S., 1985. Early events in insect neurogenesis: I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. Developmental Biology 111, 193–205.
- Dumstrei, K., Nassif, C., Abboud, G., Aryai, A., Aryai, A., Hartenstein, V., 1998. EGFR signaling is required for the differentiation and maintenance of neural progenitors along the dorsal midline of the *Drosophila* embryonic head. Development 125, 3417–3426.
- Ganformina, M.D., Sánchez, D., Bastiani, M.J., 1995. Lazarillo, a new GPI-linked surface lipocalin, is restricted to a subset of neurons in the grasshopper embryo. Development 121, 123–134.
- Ganformina, M.D., Sánchez, D., Bastiani, M.J., 1996. Embryonic development of the enteric nervous system of the grasshopper *Schistocerca americana*. Journal of Comparative Neurology 372, 581–596.
- Goodman, L.J., 1981. In: Autrum, H., (Ed.), Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system, Handbook of Sensory Physiology, vol. VII 6C. Springer, Berlin, pp. 201–286.
- Goodman, C.S., 1982. Embryonic development of identified neurons in the grasshopper. In: Spitzer, N.C., (Ed.), Neuronal Development, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 171–212.
- Goodman, C.S., Bate, M., 1981. Neuronal development in the grasshopper. Trends in Neurosciences 4, 163–169.
- Goodman, C.S., Doe, C.Q., 1994. Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system, In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), The Development of *Drosophila*. Vol. 1. Cold Spring Harbor, New York, pp. 1131–1206.
- Goodman, C.S., Spitzer, N.C., 1979. Embryonic development of identified neurones: differentiation from neuroblast to neurone. Nature 280, 208–214.
- Graf, S., Ludwig, P., Boyan, G.S., 2000. Lazarillo reveals a subset of neurons contributing to the primary axon scaffold of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. Journal of Comparative Neurology 419, 394–405.
- Hartmann, B., Reichert, H., 1998. The genetics of embryonic brain development in *Drosophila*. Molecular and Cellular Neuroscience 12, 194–205.
- Hirth, F., Reichert, H., 1999. Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. BioEssays 21, 677–684.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K., 1995. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes *orthodenticle* and *empty spiracles* in *Drosophila*. Neuron 15, 769–778.
- Hirth, F., Hartmann, B., Reichert, H., 1998. Homeotic gene action in embryonic brain development of *Drosophila*. Development 125, 1579–1589.
- Hirth, F., Loop, T., Egger, B., Miller, D.F.B., Kaufman, T.C., Reichert, H., 2001. Functional equivalence of Hox gene products in the specification of the tritocerebrum during embryonic brain development of *Drosophila*. Development 128, 4781–4788.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D., 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. Development 124, 761–771.
- Kotrla, K.J., Goodman, C.S., 1984. Transient expression of a surface antigen on a small subset of neurones during embryonic development. Nature 311, 151–153.
- Kuwada, J.Y., Goodman, C.S., 1985. Neuronal determination during embryonic development of the grasshopper nervous system. Developmental Biology 110, 114–126.
- Leuzinger, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W.J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., Reichert, H., 1998. Equivalence of the fly *orthodenticle* gene and the human *OTX* genes in

- embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125, 1703–1710.
- Locke, M., Huie, P., 1981. Epidermal feet in insect morphogenesis. *Nature* 293, 733–735.
- Ludwig, P., Williams, J.L.D., Lodde, E., Reichert, H., Boyan, G.S., 1999. Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Journal of Comparative Neurology* 414, 379–390.
- Ludwig, P., Williams, J.L.D., Nässel, D., Reichert, H., Boyan, G.S., 2001. The primary commissure pioneers in the brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: development ultrastructure and peptide expression. *Journal of Comparative Neurology* 430, 118–130.
- Ludwig, P., Williams, L., Boyan, G., 2002. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. *Microscopy Research and Technique* 56, 174–188.
- Malzacher, P., 1968. Die Embryogenese des Gehirns paurometaboler Insekten: Untersuchungen an *Carausius morosus* und *Periplaneta americana*. *Zoologie und Morphologie der Tiere* 62, 103–161.
- Meier, T., Therianos, S., Zacharias, D., Reichert, H., 1993. Developmental expression of TERM-1 glycoprotein on growth cones and terminal arbors of individual identified neurons in the grasshopper. *Journal of Neuroscience* 13, 1498–1510.
- Mobbs, P.G., 1976. Development of the locust ocellus. *Nature* 264, 269–271.
- Nambu, J.R., Franks, R.G., Hus, S., Crews, S.T., 1990. The *single-minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. *Cell* 63, 63–75.
- Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., Crews, S.T., 1991. The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67, 1157–1167.
- Ng, S.C., Perkins, L.A., Conboy, G., Perrimon, N., Fishman, M.C., 1989. A *Drosophila* gene expressed in the embryonic CNS shares one conserved domain with the mammalian GAP-43. *Development* 105, 629–638.
- Patel, N.H., Kornberg, T.B., Goodman, C.S., 1989. Expression of *engrailed* during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* 107, 201–212.
- Prokop, A., Technau, G.M., 1994. Normal function of the mushroom body defect gene of *Drosophila* is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Developmental Biology* 161, 321–337.
- Reichert, H., 2002. Conserved genetic mechanisms for embryonic brain patterning. *International Journal of Developmental Biology* 46, 81–87.
- Reichert, H., Boyan, G., 1997. Building a brain: developmental insights in insects. *Trends in Neurosciences* 20, 258–263.
- Reichert, H., Simeone, A., 1999. Conserved usage of gap and homeotic genes in patterning the CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 589–595.
- Renn, S.C.N., Armstrong, J.D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., Taghert, P.H., 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *Journal of Neurobiology* 41, 189–207.
- Sánchez, D., Ganfornina, M.D., Bastiani, M.J., 1995. Developmental expression of the lipocalin Lazarillo and its role in axonal pathfinding in the grasshopper embryo. *Development* 121, 135–147.
- Sandell, J.H., Masland, R.H., 1988. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36, 555–559.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., Goodman, C.S., 1993. Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10, 409–426.
- Smits van Prooije, A.E., Poelmann, R.E., Dubbeldam, J.A., Mentink, M.M., Vermeij-Keers, C., 1986. Wheat germ agglutinin-gold as a novel marker for mesectoderm formation in mouse embryos cultured in vitro. *Stain Technology* 61, 97–106.
- Sonnenfeld, M.J., Jacobs, J.R., 1994. Mesectodermal cell fate analysis in *Drosophila* midline mutants. *Mechanisms of Development* 46, 3–13.
- Sprecher, S.G., Reichert, H., 2003. The urbilaterian brain: developmental insights into the evolutionary origin of the brain in insects and vertebrates. *Arthropod Structure and Development* 32, 141–156.
- Strauss, R., 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotory behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 633–638.
- Tettamanti, M., Armstrong, J.D., Endo, K., Yang, M.Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., Reichert, H., 1997. Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Development, Genes and Evolution* 207, 242–252.
- Therianos, S., Leuzinger, S., Hirth, F., Goodman, C.S., Reichert, H., 1995. Embryonic development of the *Drosophila* brain: formation of commissural and descending pathways. *Development* 121, 3849–3860.
- Thomas, J.B., Crews, S.T., Goodman, C.S., 1988. Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52, 133–141.
- Urbach, R., Technau, G.M., 2003. Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Structure and Development* 32, 103–123.
- Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G.M., 2003. The pattern of neuroblast formation, mitotic domains, and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130, 3589–3606.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Hartenstein, V., 1996. Early neurogenesis in the *Drosophila* brain. *Journal of Comparative Neurology* 370, 313–329.
- Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G.J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V., 1997. Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tlx*, *otd*, *ems* and *btd*. *Developmental Biology* 182, 270–283.
- Zacharias, D., Williams, J.L.D., Meier, T., Reichert, H., 1993. Neurogenesis in the insect brain: Cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development* 118, 941–955.

Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: temporal topology organizes the neuroarchitecture of the w, x, y, z tracts

J.L.D. Williams, M. Güntner, G.S. Boyan*

Section of Neurobiology, Department of Biology II, Ludwig-Maximilians-Universität, Grosshadernerstrasse 2, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

Received 30 August 2004; accepted 1 November 2004

Abstract

The central complex is a brain specific structure involved in multimodal information processing and in coordinating motor behaviour. It possesses a highly organized neuroarchitecture, which is remarkably conserved across insect species. A prominent feature of this neuroarchitecture is the stereotypic projection of axons from clusters of neurons in the pars intercerebralis to the central body via the so-called w, x, y and z tracts. Despite extensive analyses of this neuroarchitecture in adults, little is known about its ontogeny in any insect. In this paper we use the expression pattern of the segment polarity gene *engrailed* to identify those neuroblasts belonging to the protocerebrum of the early embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. We present a new map for this brain region in which the 95 protocerebral neuroblasts in each hemisphere are organized into seven rows, as they are in the neuromeres of the ventral nerve cord. We then identify a subset of four of these neuroblasts as being the progenitor cells for four clusters of neurons, some of whose axons we show project via discrete tracts (w, x, y, z) into the central complex. These tracts begin to form prior to 39% of embryogenesis. We show further, that the cells from one of these clusters (the Z cluster) are organized according to age, and direct axons topologically according to age into the appropriate z tract. This pattern is repeated in each of the other three clusters, thus establishing a clonally based modular system of fibre tracts consistent with the model proposed for this brain region in the adult.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Insect; Embryo; Midbrain; Neuroarchitecture; Development

1. Introduction

The central complex is a brain specific structure with a

Abbreviations: A, anterior; AL, antennal lobe; An, antenna; BrdU, 5-bromodeoxyuridine; CB, central body; coc, circumoesophageal connective; com, commissure; CX, central complex; d, dorsal; DAB, diaminobenzidine; DC, deutocerebrum; EB, ellipsoid body; En, Engrailed protein; FCS, fetal calf serum; fg, frontal ganglion; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAM, goat anti-mouse; GAR, goat anti-rabbit; HRP, horseradish peroxidase; l, lateral; Lb, labrum; LOc, lateral ocellus; LuY, lucifer yellow; m, medial; Ma, mandible; Mab, monoclonal antibody; MD, median domain; MEc, mesectoderm; mid, midline; MP, midline precursor; NADPHd, beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NGS, normal goat serum; OL, optic lobe; p, posterior; PB, protocerebral bridge; PBS, phosphate-buffered saline; PC, protocerebrum; Ph, pharynx; S1, suboesophageal neuromere 1; stom, stomodeum; TC, tritocerebrum; v, ventral; Wigg, Wigglesworth staining.

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 74305; fax: +49 89 2180 74304.

E-mail address: george.boyan@lmu.de (G.S. Boyan).

highly organized neuroarchitecture which is remarkably conserved across insect species (Williams, 1975; Strausfeld, 1976, 1996; Homberg, 1987, 1991; Hanesch et al., 1989; Vitzthum et al., 1996; Wegerhoff et al., 1996; Homberg et al., 1999; Loesel et al., 2002). Located in the exact midbrain, it is thought to be involved in multimodal information processing, particularly of visual information (Homberg, 1985, 1994a, 2004; Homberg et al., 1996; Vitzthum et al., 2002), and in coordinating motor behaviour associated with the legs as documented by mutant analyses in *Drosophila* (Strauss et al., 1992; Strauss and Heisenberg, 1993; Strauss, 1996, 2002).

The central complex of the grasshopper comprises a number of substructures such as the protocerebral bridge, central body, ellipsoid body and noduli (Williams, 1975; Loesel et al., 2002). A prominent feature of this neuroarchitecture is the stereotypic projection of axons from clusters of neurons in the pars intercerebralis through, and adjacent to, the protocerebral bridge to the central body.

This projection is via a set of four fibre bundles called the w, x, y and z tracts which are bilaterally symmetrically organized astride the brain midline and represent repeating modules (Williams, 1975). Despite extensive analyses of this neuroarchitecture in adults (Williams, 1975; Homberg, 1987, 1991; Vitzthum et al., 1996; Müller et al., 1997), little is known about its ontogeny in any insect (Wegerhoff et al., 1996; Boyan and Williams, 1997; Renn et al., 1999; Seidel and Bicker, 2002). In holometaboles such as the grasshopper, the central complex is a product of embryonic development (Boyan and Williams, 1997), while in *Drosophila* it arises late in pupal development and is therefore essentially an adult structure (Renn et al., 1999). Largely because of their repetitive organization, the w, x, y and z fibre bundles offer an ideal substrate for molecular and cellular studies towards a better understanding of how modular brain regions become organized.

In this paper we use the expression pattern of the segment polarity gene *engrailed* to identify those neuroblasts belonging to each protocerebral hemisphere of the early embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. We present a new map for this brain region in which the 95 neuroblasts we count are organized into seven rows, as they are in the neuromeres of the ventral nerve cord. We then identify a subset of four of these neuroblasts as being the progenitor cells for four clusters of neurons (W, X, Y, Z) whose axons we show project via four discrete tracts (w, x, y, z) into the central complex. These tracts begin to form prior to 39% of embryogenesis. We show further, that the cells from one of these clusters (the Z cluster) are organized according to age, and direct axons topologically according to age into the appropriate tract. This pattern is repeated in each of the other three clusters, thus establishing a clonally based modular system of fibre bundles consistent with the model proposed for this brain region in the adult (Williams, 1975).

2. Materials and methods

2.1. Animals

S. gregaria eggs from our own crowded culture were incubated at 30 °C in moist aerated containers. Embryos were staged at time intervals equal to percentage of embryogenesis as described by Bentley et al. (1979). All experiments were performed according to the guidelines for animal welfare established by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

2.2. Immunocytochemistry

Embryos were dissected out of the egg in 0.2 M PBS, staged, freed from embryonic membranes and yolk, washed in PBS and fixed in Pipes-FA (100 mM PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 3.7% paraformaldehyde; pH 7.4) for

60 min. Embryos were then washed again for 1 h in PBS before being placed in a preincubation medium: either 0.1% PBT (0.2 M PBS containing 0.1% Triton X-100), or 5% FCS in 0.2 M PBS, for 60 min.

For Engrailed immunocytochemistry, the embryos were incubated as above then transferred to anti-Engrailed primary antibody (Mab 4D9, diluted 1:1 in incubation solution) for 16 h at room temperature. After washing in PBT, embryos were incubated with Dako EnVision™ peroxidase (PO)-conjugated secondary antibody (goat anti-mouse, 1:4 dilution in PBT) for 4 h at room temperature. After further washing, DAB staining was carried out using Sigma Fast DAB tablets, the staining being intensified with 0.075% ammonium nickel sulphate. The DAB reaction was stopped by washing in PBS, subsequent to which embryos were placed in 90% glycerol in PBS. Preparations were viewed as wholemounts, with selected embryos being subsequently embedded in soft Epon and sectioned at 20 µm thickness.

2.3. Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

For 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in whole embryo culture, eggs were sterilized in 70% ethanol for 60 s, blotted dry on filter paper, and then for dissection transferred into a solution of filtered sterilized insect medium (Mitsubishi and Maramorosch, Sigma) supplemented with 10% FCS, penicillin–streptomycin (5 µl/ml) and 20-hydroxycyclohexanone (150 µg/ml). The embryos were then incubated in a cell culture dish containing the above medium together with BrdU (final concentration 10^{−2} M). The incubation took place at 30 °C with gentle agitation over pulses of 15–16 h (this represents approximately 3% of development for each stage examined). After incubation, embryos were restaged, fixed for 1 h in Pipes-FA, washed thoroughly in PBS, and their DNA denatured in a solution of 2N HCl in PBS for 20 min.

For BrdU immunocytochemistry, embryos were incubated in a blocking solution of 0.4% PBT (PBS plus 0.4% Triton X-100), 5% NGS and 0.2% BSA for 45 min. The primary anti-BrdU antibody (Sigma) was diluted 1:200 in the blocking solution, and embryos maintained in this solution for 24 h at 4 °C with gentle agitation. Embryos were then washed in 0.025% PBT (PBS plus 0.025% Triton X-100), and incubated in the secondary antibody (Dako EnVision™, goat anti-mouse, dilution 1:4 in PBS) at room temperature under gentle agitation for 15–16 h. Embryos were then washed in PBS, stained with DAB (DAB Fast tablets, Sigma) and the signal intensified by adding 0.02 M NiCl₂. The reaction was stopped through several rinses with PBS. Preparations were viewed in 90% glycerol in PBS or embedded in Epon and sectioned at 20 µm thickness.

2.4. Intracellular dye injection

Wholemount embryos were laid dorsal side up on a Silgard[®] covered glass slide and held in place with fine entomological pins. Alternatively, agarose brain sections (70 μ m thick) floating in PBS were placed singly on a glass slide, the fluid drained in order to achieve adhesion to the substrate, and then re-covered with PBS to prevent dessication. Cells to be injected were visualized using an $\times 50$ Leitz long distance water immersion objective mounted on a fixed stage Zeiss compound microscope. Cells were impaled with low resistance (10–20 M Ω) thin walled glass micropipettes and filled iontophoretically with 2% lucifer yellow dye dissolved in 2 M lithium acetate using constant hyperpolarizing current for 5 min. Immediately after injection, the embryos were fixed for 45 min in 2% paraformaldehyde, washed thoroughly, and then placed in 90% glycerol in PBS for viewing.

2.5. Wigglesworth's osmium tetroxide–ethyl gallate histology

The embryos were dissected out and freed from membranes in PBS. After a short wash the embryos were staged, then fixed in Carnoy fixative (60% ethanol, 30% chloroform, 10% glacial acetic acid) for 1 h and brought to distilled water through a descending ethanol series. The postfixation of the brain tissue in 1% osmium tetroxide for at least 17–48 h was followed by thorough washing in distilled water. For signal intensification, the embryos were maintained in a saturated aqueous solution of ethyl gallate (several changes over 48 h at room temperature). The tissue was then washed in distilled water, dehydrated through an ascending ethanol series to propylene oxide, embedded in soft Epon, sectioned at 14 μ m thickness, and mounted in Permount.

2.6. NADPH-diaphorase staining

Staged embryos were dissected from their eggs in HEPES-buffered saline (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 mM sucrose, 20 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.2) and subsequently fixed in ice-cold methanol/37% formaldehyde (9:1 by volume) for between 30 and 60 min. Embryos were then lightly rinsed in several changes of 0.1 M Tris buffer, pH 7.2, on ice and washed again thoroughly in Tris-Tx (0.1 M Tris, pH 8.0, 0.2% Triton X-100). They were immersed in a staining solution of 0.2 mM nitro blue tetrazolium (NBT) and 0.2 mM NADPH in Tris-Tx at 4 °C, in the dark, for 18 h with gentle shaking. Stained tissue was inspected visually and if necessary, further incubation was undertaken in a fresh staining solution at room temperature and in the dark.

When adequately stained, the embryos were washed well in distilled water and cryoprotected by infiltration with an ice-cold solution of 20% sucrose in 0.1 M phosphate buffer

and 0.005% sodium azide for 2–3 h until they sank. Embryos were then embedded in Jung tissue freezing medium (Leica, Germany) in brass-based moulds and quenched in liquid nitrogen. The frozen blocks were mounted on cryostat chucks, cut on a cryostat at 30 μ m thickness. Frozen sections were thaw-mounted on chrome alum/gelatine slides and air dried at room temperature. The slides were then washed thoroughly in distilled water and cover slipped under glycerol–gelatine jelly.

2.7. Imaging

Histological sections of the brain were viewed under a Leica B4000 microscope, the images captured with a Canon 4 MP digital camera, and processed using Adobe Photoshop Elements[™].

2.8. Neuraxes

The axes used for neuroanatomical analysis in this study are neuraxes, not body axes (Boyan et al., 1993). Accordingly, the top of the brain (in the head) is neurally anterior, the front of the brain is neurally ventral, the back of the brain is neurally dorsal, and the base of the brain is neurally posterior. Planes of sections are also named with respect to the neuraxis, not the body axis.

3. Results

3.1. Neuronal organization of the central complex in the brain of the adult grasshopper

The central complex is the most prominent neuroanatomical structure of the midbrain of the adult grasshopper (Fig. 1A). Comprising protocerebral bridge, central body, ellipsoid body, noduli, and lateral accessory lobes, its adult structure has been extensively documented over many years (Williams, 1975; Vitzthum et al., 1996; Homberg, 1991; Loesel et al., 2002). A feature of its neuroarchitecture is the highly conserved pattern of axonal projections from cells of the pars intercerebralis which make up the so-called w, x, y and z bundles of the central body (Williams, 1975). The modular organization of this brain region is obvious when we compare the morphology of cells expressing for example, serotonin and allostatin (Fig. 1B). We could equally have documented this modularity using the expression pattern of a range of other molecules (Homberg, 1994b, 2002).

The question at the centre of this study, however, is when and how these stereotypic projections arise during embryology. A section through the central complex of an 85% embryonic grasshopper following diaphorase histochemistry (Fig. 1C) shows NO positive axonal projections already organized into w, x, y, z bundles as in the adult (cf. Fig. 1B). Clearly, the central complex has adult characteristics well

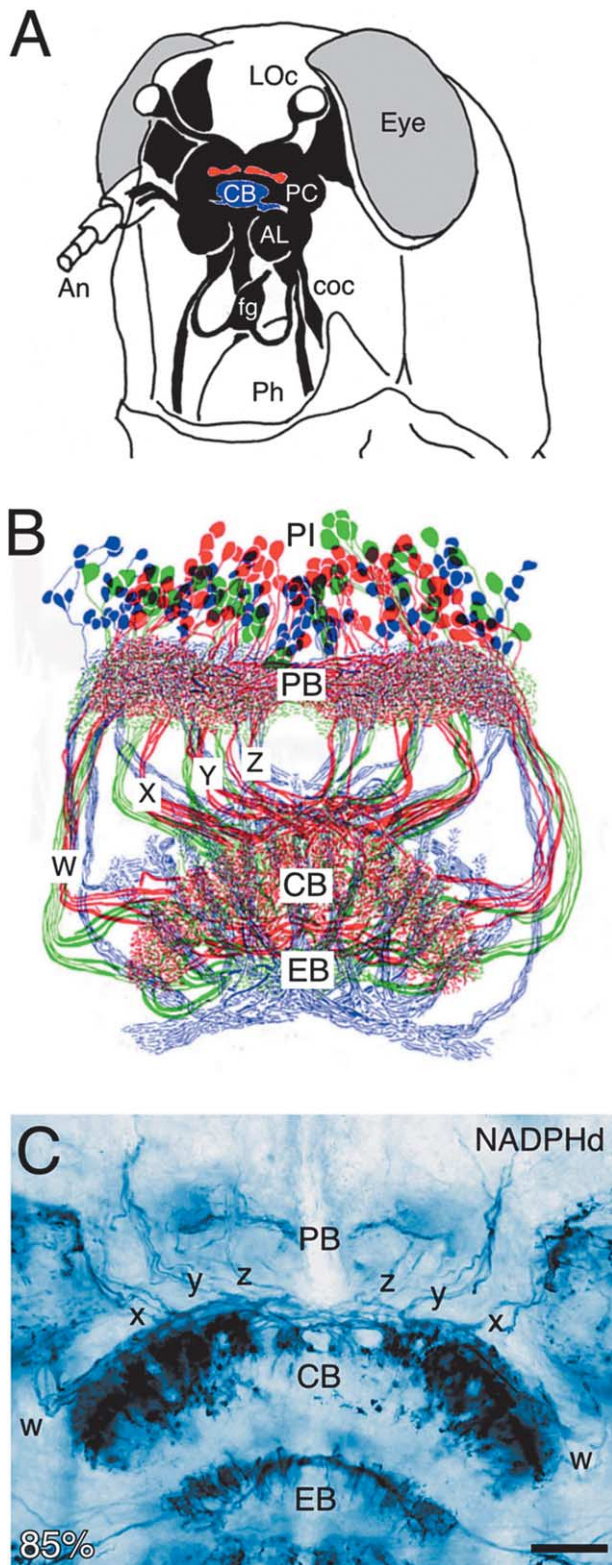


Fig. 1. Neuronal organization of the central complex in the brain of the grasshopper. (A) Schematic view of the head with the brain (black) exposed shows the location of the central body (blue) and protocerebral bridge (red) in the midbrain. (B) Organization of the central complex in the adult grasshopper as revealed by overlaying reconstructions of cells from different preparations following immunocytochemistry for serotonin (red) and allostatin (ASC1 subpopulation, blue; ASC2 subpopulation, green).

before hatching, and we need to look earlier during embryology for the origins of its neuroarchitecture.

3.2. Organization of protocerebral neuroblasts in the early embryonic brain

Establishing the ontogeny of the w, x, y, z fibre bundles of the central complex requires identification of those neuroblasts whose progeny contribute the relevant axonal projections. We ascertained that an identification of these neuroblasts, in turn, required a reassessment of the neuroblast map of the brain as originally published by Zacharias et al. (1993). This original map described the organization of neuroblasts in the embryonic neuromeres of the brain only according to adult landmarks such as the antennal and optic lobes, and did not take additional molecular evidence for segment borders into consideration. We decided to reassess the neuroblast map with respect to the molecular expression pattern of the segment polarity gene *engrailed* which has been shown to delimit the posterior segment border throughout the arthropod nervous system (Patel et al., 1989). When we examined *engrailed* expression in the head of the grasshopper early in embryogenesis (27%), a time when all the neuroblasts have delaminated, we see (Fig. 2A) clear expression stripes marking the posterior compartment of the mandibular (S1) and tritocerebral (TC) segments, a cluster of expressing cells at the posterior edge of each deutocerebrum (extending into the posterior epithelium of each antenna), and a large cluster in each protocerebrum just anterior to the antennal lobe.

The w, x, y and z fibre bundles derive from cells of the pars intercerebralis and which have a protocerebral ontogeny (Williams, 1975; Ludwig et al., 2002). Our focus is therefore on this neuromere, and we provide a new detailed map of the neuroblasts within it. The *engrailed* expression pattern gives us some evidence as to the anatomical limits of the protocerebrum in which to conduct our assay: everything anterior of the antennal lobe out to, but not including, the optic lobes; and antero-medial to the midline. It should be noted that classical neuroblasts may well be present within the optic lobes but their analysis is beyond the scope of this present study as none of their progeny contribute to the w, x, y, z tracts of the central complex. Our most important finding (Fig. 2B–F) is that the 95 protocerebral neuroblasts can be grouped into seven rows from anterior to posterior, just like the conventional map for

Note the highly conserved pattern of axonal projections from cells of the PI making up the w, x, y and z bundles. Data are modified from Homberg (1991) and Vitzthum et al. (1996). (C) Section through the brain of an 85% embryonic grasshopper following diaphorase histochemistry reveals the presence of NO positive axonal projections within the central complex organized into w, x, y, z tracts as in the adult (cf. B). Scale bar in C represents 1 mm in A, 60 μ m in B, and 25 μ m in C.

the neuromeres of the ventral nerve cord (Bate, 1976; Doe and Goodman, 1985a).

Our new map of the protocerebral neuroblasts in one hemisphere of the brain was derived from serial sections following Wigglesworth histology reconstructed first at 33% of embryogenesis (Fig. 2B) and again at 47% of embryogenesis (Fig. 2C). We compared these data with neuroblast distributions in preparations which had been treated with the *engrailed* antibody (Fig. 2A). As noted above, *engrailed* expression, by definition, identifies the most posterior protocerebral neuroblasts, so that the final row of *engrailed* expression delimits the border with the deutocerebrum (Fig. 2B and C). We therefore began the analysis at this most posterior row and counted forwards until we reached the most anterior neuroblasts of the protocerebrum. Inspection of the brain at 33% of embryogenesis (Fig. 2B) shows that the protocerebral neuroblasts can be ordered into seven rows. We numbered the rows from anterior to posterior following the example of Doe and Goodman (1985a) for thoracic neuromeres, and then colour coded these rows accordingly. It should be noted that the brain is not flat like the neuromeres of the ventral nerve cord, and that the anterior most region according to the neuraxis curves dorso-posteriorly (cf. rotated view in Fig. 2F), giving the false impression that the yellow row may not be the most anterior in the protocerebrum. To account for this curvature, we topologically ‘flattened’ the brain before performing our analysis. It is clear that not all the rows are linearly continuous as in the ventral nerve cord. This is partly due to the presence of spaces in the brain where no neuroblasts (or other cell types) are present. These spaces are real and not artefacts of fixation. The spaces will be later filled, for example, by the neuropilar regions of the mushroom bodies (Boyan and Williams, 1997), structures which are not present in the ventral nerve cord. While allocating neuroblasts to a particular row is admittedly a matter of judgement and may appear somewhat capricious, we feel we have analysed our data conservatively. Nevertheless, the production of this map should be seen as a first step, and future studies based on additional molecular criteria may demand a revision of our scheme.

Given these caveats, the next step was to provide each neuroblast with a numerical identity within its row. Neuroblasts were numbered as for the ventral nerve cord (Doe and Goodman, 1985a), that is, from medial to lateral within each row (e.g. 3-1, 3-2...). In the case of the brain, we began at the midline and ran out towards the optic lobe (Fig. 2B). This procedure allows us to make an absolute count of neuroblasts present in the protocerebrum at 33% of embryogenesis, with the following result: row one comprises 10 neuroblasts; row two, 9; row three, 14; row four, 12; row five, 13; row six, 20; and row seven, 17; giving a total of 95 neuroblasts in each protocerebral hemisphere of the brain. This procedure was repeated for both hemispheres of further preparations at 33, 37 and 47% of embryogenesis with the same result.

A comparison of the neuroblast map at 33% (Fig. 2B) with that at 47% of embryogenesis (Fig. 2C) shows that all the neuroblasts are still present, their basic organization is the same, but they are more dispersed due to the presence of their progeny and developing neuropilar regions (Fig. 3). Further, *engrailed* expression in the protocerebrum is dynamic and has disappeared from this neuromere by 47% of embryogenesis.

In order to understand the topology of these neuroblasts better, we required a mechanism with which we could present their organization in 3D and in a rotatable form. We therefore measured the precise location of each protocerebral neuroblast from a 33% embryo in *x*, *y* and *z* planes with respect to a fixed reference point located in the posterior brain midline. These coordinates comprised the data set for a computer generated, rotatable, 3D model of neuroblast distributions (Fig. 2D–F). We also provide accompanying films showing the rotation in *x*, *y* and *z* planes in Quicktime™ format. The model accurately depicts the centre point of all neuroblasts and therefore a plan of their relative distribution, but not their various shapes and sizes (cf. Fig. 2B and C). Nevertheless, this approach has the advantage that all 95 protocerebral neuroblasts from one hemisphere can be clearly visualized individually via appropriate rotation of the brain.

Our computer-based 3D model shows the protocerebral neuroblasts in one hemisphere, coloured according to row as before (cf. Fig. 2B), first viewed from ventral (from the front of the head). The organization of neuroblasts clearly reflects that derived from the anatomical reconstruction (Fig. 2B). The most anterior row of neuroblasts (coloured yellow) is located dorsally and is therefore at the very back of the brain from this perspective. Rotation of the head forwards about the *y* axis so that the neuroblasts are viewed from anterior (down onto the top of the head) reveals (Fig. 2E) the concentration of neuroblasts ventrally in the brain, and the large space medially where the mushroom body will form. A further rotation about the *z* axis so that the protocerebral hemisphere is viewed from the midline of the brain out towards the optic lobes (Fig. 2F) shows the curvature of the brain anteriorly, which, when topologically flattened, reveals the neuroblasts of row one (yellow) to be the most anterior.

3.3. Identified neuroblasts and their lineages in the embryonic protocerebrum

An ontological analysis of the *w*, *x*, *y* and *z* bundles of the central complex requires not only that the appropriate neuroblasts be identified, but also that the lineages of their progeny be ascertained. The lineages associated with a number of identified neuroblasts are shown in brain section following incorporation of BrdU and subsequent anti-BrdU immunocytochemistry (Fig. 3A). Our data show that the initial lineages associated with neuroblasts are organized into columns; that these columns are stereotypically

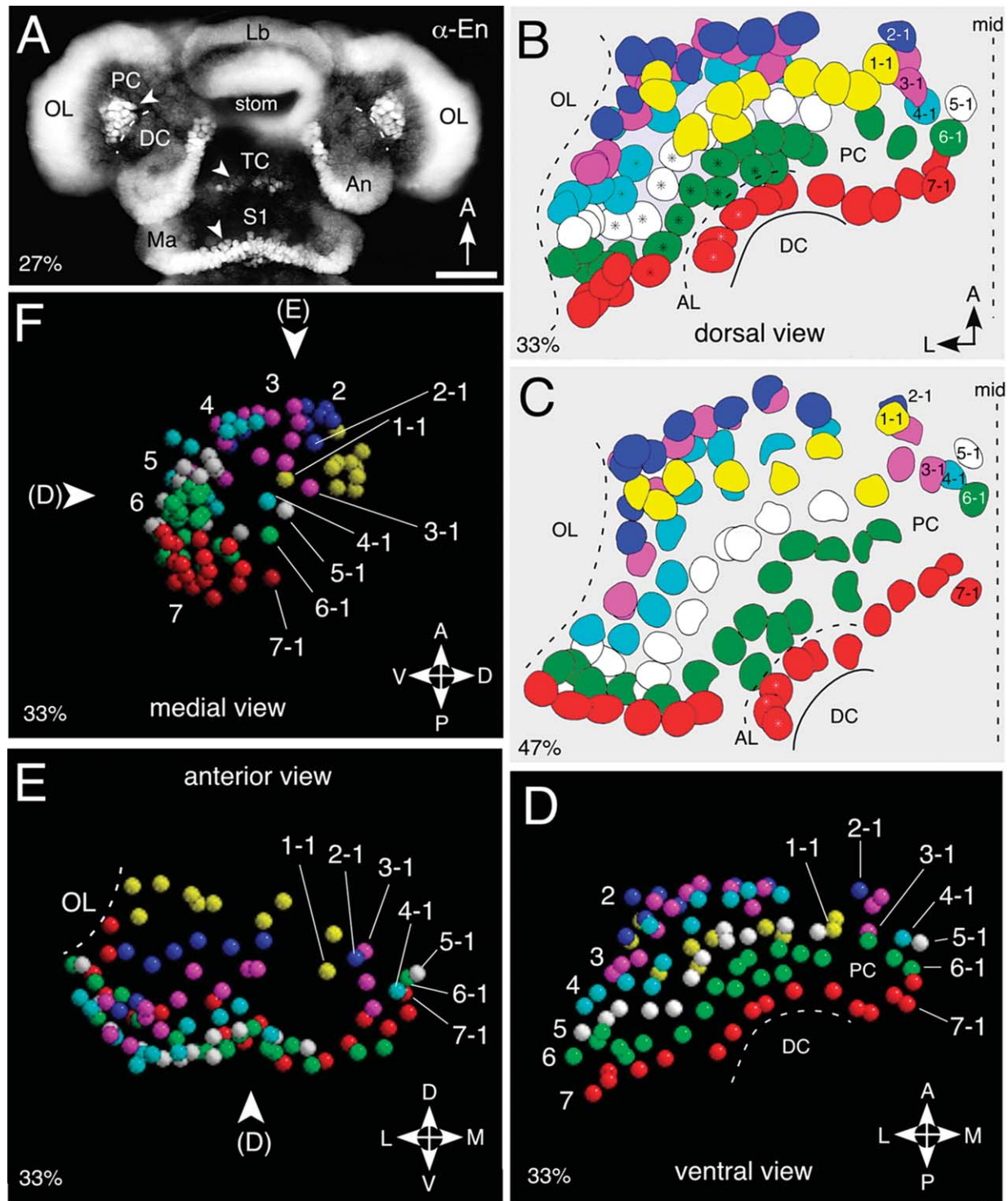


Fig. 2. Organization of protocerebral neuroblasts in the early embryonic brain. (A) Head of an embryonic grasshopper (27%) viewed in wholemount and from dorsal following engrailed immunocytochemistry. Engrailed-positive cells delimit the posterior border of each neuromere (white arrowheads) and in some cases extend into the epithelium of the associated appendage. White dashed line marks the border between the protocerebrum and the antennal lobe of the deutocerebrum in each hemisphere. Arrow indicates anterior, A. (B) Map of the protocerebral neuroblasts in one hemisphere at 33% of embryogenesis as reconstructed from serial sections and viewed from dorsal. Neuroblasts can be organized into seven rows, which are colour coded progressively from anterior to posterior (yellow, blue, crimson, cyan, white, green, red). Neuroblasts are numbered from medial to lateral within each row (e.g. 3-1, 3-2...) beginning at the midline (mid) and running out to the optic lobe (OL), but for clarity only the first neuroblast in each row is numbered here. The curvature of the brain leads to the false impression that the yellow row is not the most anterior in the PC (cf. rotated view in 'F'). Black asterisks indicate the neuroblasts which are Engrailed-positive in 'A' above; white asterisks indicate neuroblasts which are Engrailed-positive and which will later be incorporated into the antennal lobe. (C) Map of the protocerebral neuroblasts in one hemisphere as in 'B' above but at 47% of embryogenesis reveals more clearly their organization into seven rows. Engrailed

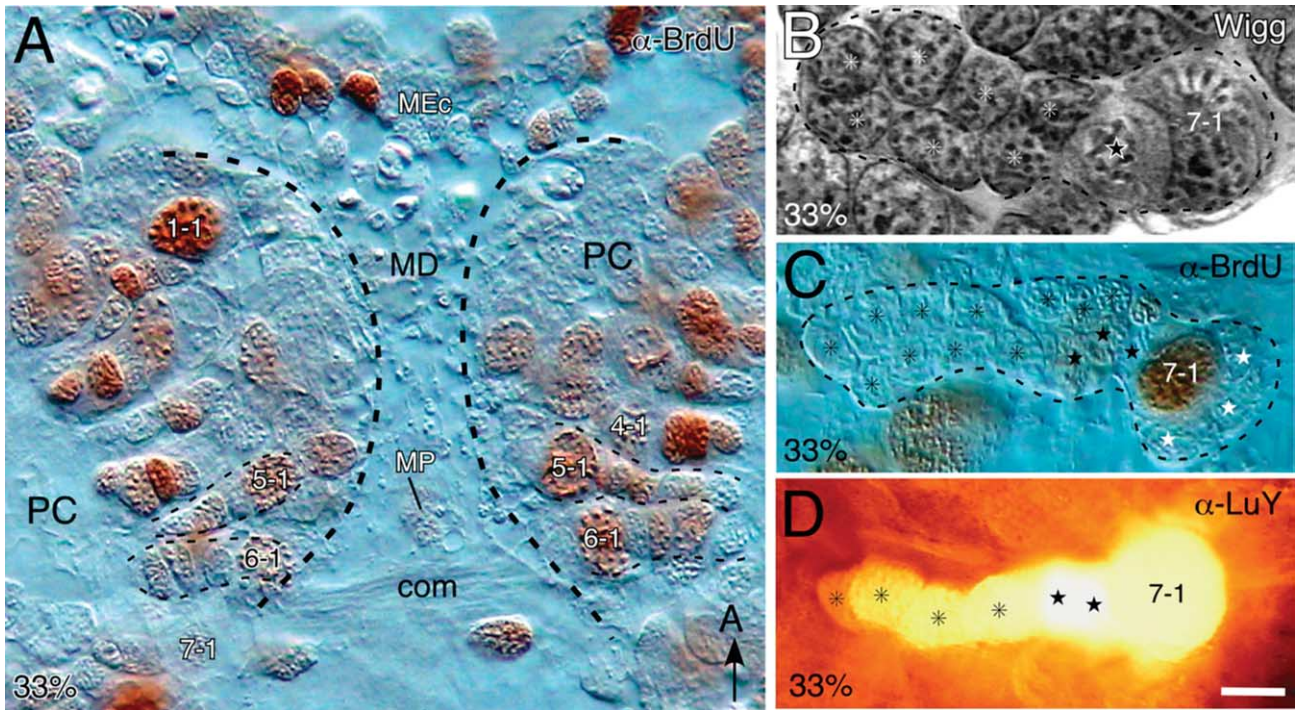


Fig. 3. Identified neuroblasts and their lineages in the embryonic protocerebrum. (A) Photomicrograph using differential interference contrast (DIC) optics of a section of the brain at 33% of embryogenesis following incorporation of BrdU and subsequent anti-BrdU immunocytochemistry. Mitotically active cells (stained brown) are present in each protocerebral hemisphere (PC), in the mesectodermal epithelium (MEc) and the median domain (MD). Representative neuroblasts of the protocerebrum have been numbered according to the plan shown in Fig. 2. The section shows several identified neuroblasts with their associated lineages, also containing mitotically active cells. (B and C) Establishing lineage relationships in the protocerebrum. Lineages were associated with identified neuroblasts using a combination of methods: Wigglesworth histology (B) shows the column of progeny (black star = ganglion mother cell, white asterisk = neuronal progeny) associated with neuroblast 7-1 at 33% of embryogenesis. (C) BrdU incorporation and subsequent immunocytochemistry reveals neuroblast 7-1, its associated sheath cells (white stars), ganglion mother cells (black stars), some of which are weakly BrdU positive, and column of progeny (black asterisks) at 33% of embryogenesis. (D) Intracellular injection of lucifer yellow into the 7-1 neuroblast alone subsequently dye couples to its associated ganglion mother cells (black stars) and neuronal progeny (black asterisks). No other lineages are stained. Thirty-three percent of embryogenesis. Scale bar in D represents 25 μ m in A, 10 μ m in B–D.

orientated in the brain; and that this orientation relates to the location of a given neuroblast in the brain. Later development, however, shows extensive cell clusters to be associated with protocerebral neuroblasts building the central complex (Fig. 5).

We ascertained the lineage associated with a given neuroblast (representatively neuroblast 7-1) via three methods. First, Wigglesworth histology (Fig. 3B), then BrdU incorporation (Fig. 3C), and finally intracellular dye injection (Fig. 3D). All three methods provide comparable results: the direction and shape of the initial column of progeny is the same, specific cell types such as ganglion mother cells are identifiable, as is the number of progeny comprising the lineage, at least early in development.

Using a combination of these methods we followed the

subsequent development of neuroblasts and their lineages to the stage (33–37%) where progeny generated axonal projections which we could identify as contributing to the w, x, y, or z bundles of the central complex. We identified four neuroblasts whose progeny contribute to these bundles (Fig. 4): neuroblast 1-1 generates the W cell cluster; neuroblast 2-1 generates the X cell cluster; neuroblast 3-1 generates the Y cell cluster; and neuroblast 4-1 generates the Z cell cluster. A 3D model of a subset of neuroblasts from the protocerebrum (Fig. 4A) reveals these neuroblasts to be the most medial cells of the first four anterior-most rows of the brain. In side view (Fig. 4B), the model shows that three (1-1, 2-1, 3-1) are grouped together antero-dorsally (Fig. 4B), the other (4-1) is located ventrally in the protocerebrum.

expression is dynamic and has disappeared at this age. (D) Computer based 3D model of neuroblast distribution in the protocerebrum at 33% of embryogenesis with the brain viewed from ventral (front of the head). Data derive from the preparation in 'B' above. Neuroblast positions, but for clarity not neuroblast size, are accurate in D, E, F. Colour coding as in 'B, C' above. The first (most medial) neuroblast in each row is indicated. (E) 3D model of neuroblast distribution in the protocerebrum now viewed from anterior (top of the head) after 90° rotation from that seen in 'D' (arrowhead). The yellow row of neuroblasts is clearly the most dorsal in the PC. (F) 3D model of neuroblast distribution now viewed from medial, that is from the brain midline out to the eye, following a 90° rotation of the view in 'D' about the y axis. Allowing for the curvature of the brain, the yellow row of neuroblasts is the most anterior in the protocerebral neuraxis. Scale bar in A represents 150 μ m in A, 50 μ m in B, 75 μ m in C.

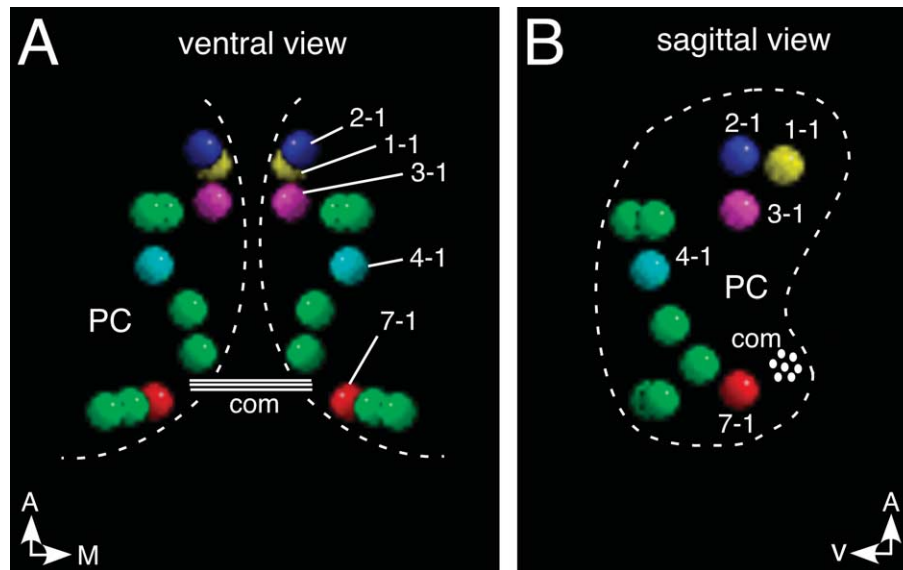


Fig. 4. Computer based 3D models of protocerebral neuroblasts involved in generating the w, x, y, z tracts of the central complex. Thirty-three percent of embryogenesis. Only the relative locations, not the size, of neuroblasts are accurate. (A) Protocerebrum viewed from ventral. Only the first neuroblast from each row (numbering as in Fig. 2) is shown in each hemisphere (medial border dashed white). Progeny of neuroblasts 1-1, 2-1, 3-1 and 4-1 will be shown below to generate the w, x, y, z tracts respectively. Neuroblast 7-1 is shown for reference (cf. Fig. 3B–D), as is the location of the primary brain commissure (com). (B) 3D model as in 'A' but rotated 90° to generate a sagittal view of neuroblast distribution. Neuroblasts 1-1, 2-1, 3-1 are located antero-dorsally in the brain, neuroblast 4-1 medio-ventrally, while the most posterior row commences with neuroblast 7-1. The approximate extent of the protocerebrum is outlined. Protocerebral neuroblasts not involved in this study are coloured green (for interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

3.4. Development of the lineage generating the z tract of the central complex

We selected one of these four neuroblasts (4-1) for detailed study and followed the development of its lineage (the Z cluster) over 20% of embryogenesis (Fig. 5). In particular, we examined the manner in which the axon projections from the 4-1 lineage establish the z tract of the central complex.

Neuroblast 4-1 generates its initial progeny (a set of ganglion mother cells) at around 30% of embryogenesis (Fig. 5A). The lineage of these ganglion mother cells subsequently bends ventrally (Fig. 5B) and by 39% the cluster of progeny comprises approximately 50 neuronal progeny. The first axons to contribute to the z tract appear just prior to 39% of embryogenesis, however we cannot yet identify these pioneer axons individually. By 50% of embryogenesis (Fig. 5C), the 4-1 cluster contains approximately 100 cells, and assumes a stereotypic half-spherical shape. We were able to identify a subset of approximately 25 cells from this cluster which contribute axons to the z tract at this age.

An examination of the axons projecting into the z tract from this subset of cells (Fig. 6) shows that there is a clear regionalization with respect to position of the respective cell body within the Z cluster. Neuronal age in a given cluster is measured by relative distance from the neuroblast—the oldest progeny are the most distant. In the case of the 4-1 cluster, our analysis shows that the oldest cell bodies of the

subset that we could identify with axons in the z tract, the 'a' population, lie postero-dorsally and direct axons into the most posterior part of the z tract. The next oldest, the 'b' population, direct axons more anteriorly into the medial part of the z tract. The youngest population we identified, the 'c' population, direct axons anteriorly into the z tract.

We feel that while we are only dealing with about a quarter of the total number of cells in the cluster (100), we consider the 4-1 cluster to be topologically ordered according to neuronal age, and for this to determine the projection pattern of axons into the z tract. We then complemented this analysis of the 4-1 cluster by examining the axon projections in all four tracts (w, x, y, z) of the central complex (Fig. 7). Our comparison of the axonal organization of these tracts reveals a neuroarchitecture suggestive of putatively equivalent modules. Fibre groups with clearly the similar axon size, and constituent number, appear at equivalent locations in all four tracts. Tracing these axons has previously shown that their associated cell bodies are putatively homologous (Williams, 1975), which leads us to suggest that the temporal topology model we propose for the Z cluster also applies to the W, X and Y clusters.

4. Discussion

Like its vertebrate counterpart, the insect brain comprises neuropilar regions of very different neuroarchitectural

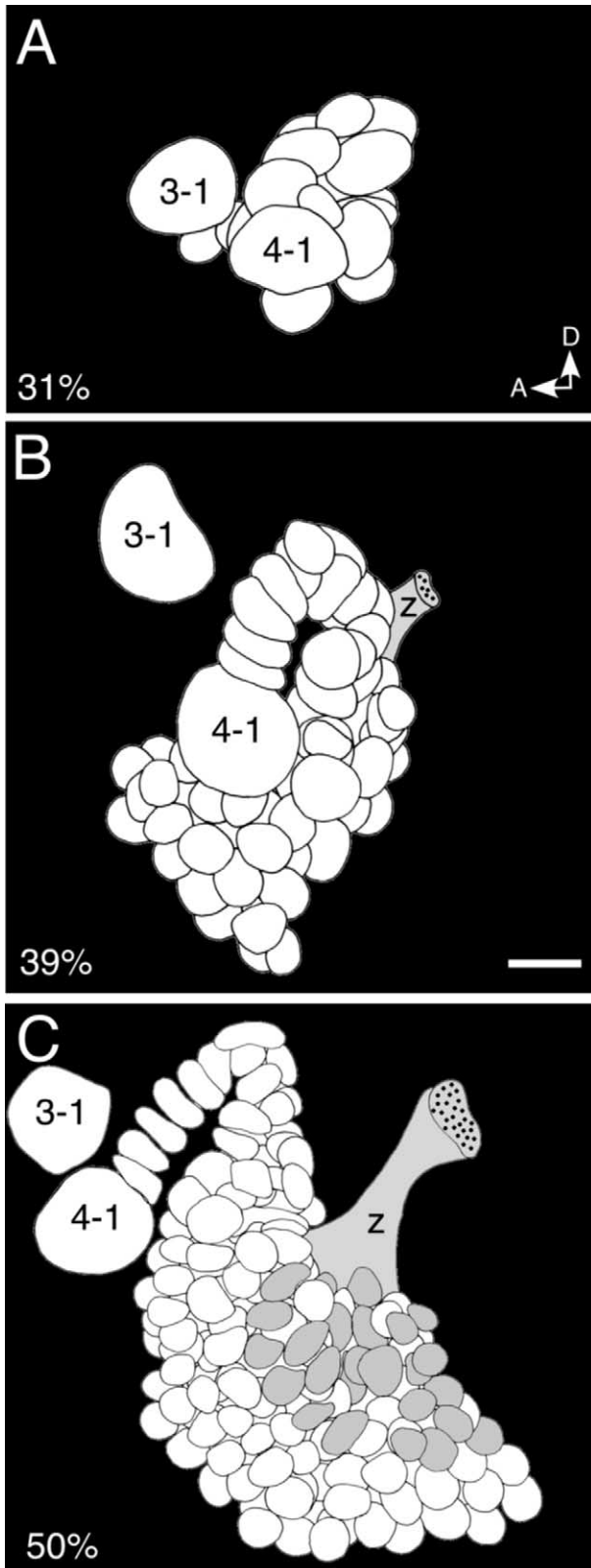


Fig. 5. Development of the lineage generating the z tract of the central complex as revealed by reconstructions from serial section. (A) At 31% of embryogenesis, neuroblast 4-1 has generated about 15 progeny, none of which have yet pioneered the z tract. (B) At 39% of embryogenesis, neuroblast has generated over 50 progeny. The first eight cells visible after

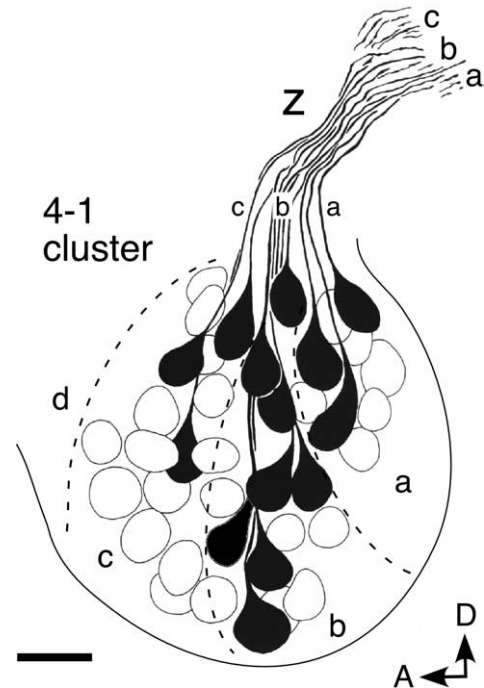


Fig. 6. Temporal topology of axonal projections in a tract of the central complex. Reconstruction from serial sections of the 4-1 clusters at 50% of embryogenesis reveals a regionalization of projections into the z tract based on age. The oldest cells in the cluster (region a) are located furthest from their neuroblast, and project axons most posteriorly into the z tract. Progressively younger progeny (b, c, d regions, respectively), direct axons into more anterior parts of the z tract. Scale bar represents 20 μm.

complexity (Bullock and Horridge, 1965; Strausfeld, 1976; Kandel et al., 1991). Among the most highly organized regions are the mushroom bodies (Strausfeld, 1976; Strausfeld et al., 1998), the central complex (Williams, 1975; Loesel et al., 2002), and the optic lobes (Strausfeld, 1976). All these structures have one feature in common, namely a modular neuroarchitecture (Leise, 1990; Mizunami et al., 1997; O'Shea et al., 1998; Strausfeld, 1998; Strausfeld et al., 1998) which has recently been proposed to develop along clonal lines (Ito et al., 1997; Boyan and Williams, 1997; Tettamanti et al., 1997; Renn et al., 1999; Farris and Sinakevitch, 2003).

Whereas the gross organization of the mushroom bodies has been shown to differ among arthropods (Bullock and Horridge, 1965; Howse and Williams, 1969; Strausfeld, 1998; Strausfeld et al., 1998), that of the central complex appears more highly conserved, even though the lifestyles of the invertebrates involved vary considerably (Howse and Williams, 1969; Loesel et al., 2002). In grasshoppers, the

the neuroblast are ganglion mother cells and can be seen to form a characteristic bend extending ventral (deeper) in the brain. The z tract is now visible but contains less than 10 fibres. (C) At 50% of embryogenesis, there are over 100 progeny in the cluster. Those cells, which can be identified as making an axonal contribution to the z tract, are shaded grey, but this selection is only representative and not exclusive. Scale bar in B represents 15 μm throughout.

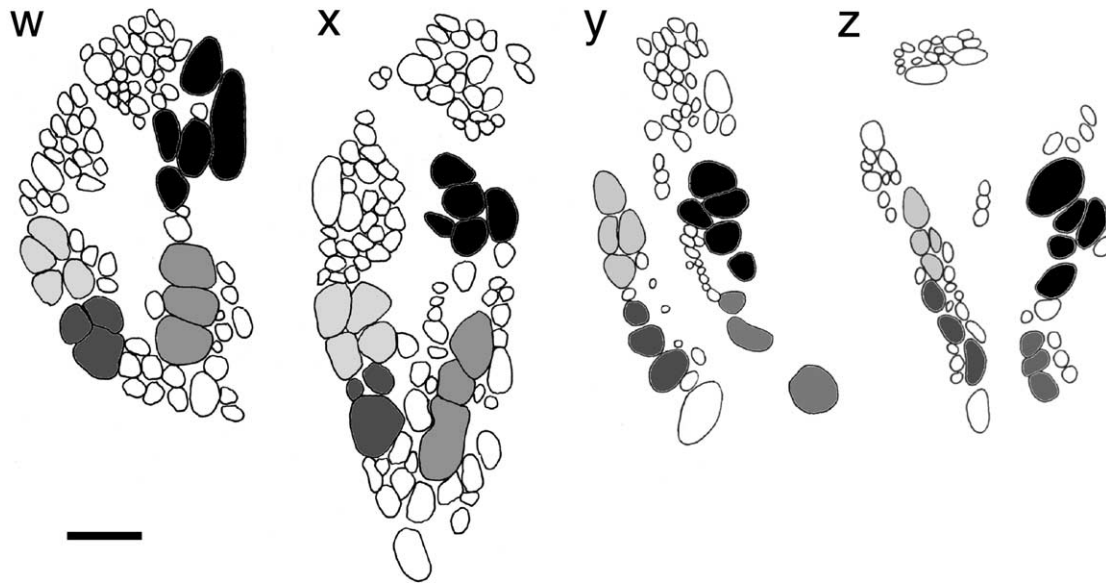


Fig. 7. Fibre distributions in w, x, y and x tracts of the adult central complex suggest a neuroarchitecture based on repeating modules. Fibre groups which we consider to be equivalent based on their size, location, number, and origin, are shaded the same gray. Scale bar represents 10 μ m.

expression patterns of neurotransmitters, peptides and other messenger substances such as NO reveal a stereotypic neuroarchitecture for the central complex (Fig. 1B; Homberg, 1987, 1991, 2002; Vitzthum et al., 1996; Loesel et al., 2002). In particular, the so-called w, x, y and z tracts comprise highly repetitive elements representing a precise point-to-point projection of axons from identified groups of bilaterally symmetrical cell body clusters in the pars intercerebralis into identified commissures of the protocerebrum (Williams, 1975; Homberg, 1987, 1991, 2002; Boyan et al., 1993; Vitzthum et al., 1996; Boyan and Williams, 1997). Despite these many studies detailing the adult neuroarchitecture of the w, x, y and z tracts, only a single study has attempted to analyse their ontogeny in the grasshopper (Boyan and Williams, 1997). That ontogeny must be embryonic, since the tracts are already present, and in their adult configuration, at 85% of embryogenesis (Fig. 1C; Boyan and Williams, 1997). This represents one major difference between the developmental program generating the central complex in hemimetabolous insects such as the grasshopper, and that in the holometabolous fly, where the central complex is a late pupal and therefore essentially adult phenomenon (Renn et al., 1999).

We previously proposed that four protocerebral neuroblasts occupied positions in the embryonic brain at the appropriate age, and generated columns of progeny with the correct orientation, for them to contribute axons to the w, x, y and z tracts of the central complex (Boyan and Williams, 1997). That study fell short of providing lineage analyses of these neuroblasts, or of identifying the pattern of axon projections from their progeny, to confirm the manner in which the tracts are formed. Our present study addresses both these aspects and presents a model of tract formation based on an age-dependent topology of axon projections.

4.1. A new neuroblast map: the protocerebral neuroblasts can be sorted according to the plan for the ventral nerve cord

In order to identify the neuroblasts responsible for building the w, x, y and z tracts of the central complex we first had to re-analyse the original protocerebral neuroblast map for the grasshopper (Zacharias et al., 1993). That original map, while providing an overall count for all neuroblasts of the brain, allocated neuroblasts to a given neuromere based on their position with respect to certain adult structures such as the antennal or optic lobes, rather than employing additional molecular criteria which are ultimately defining (Broadus et al., 1995; Younossi-Hartenstein et al., 1996, 1997; Meinertzhagen et al., 1998; Boyan and Williams, 2000, 2002; Urbach and Technau, 2003; Urbach et al., 2003a,b). Neuroblasts are known to translocate in the developing brain (Boyan et al., 1995c, 1996; Boyan and Williams, 1997; Urbach and Technau, 2003) so that structural criteria are not necessarily reliable for ascertaining segmental identity. Indeed, we have shown using the expression pattern of the segmental polarity gene *engrailed* that Engrailed immunoreactive protocerebral neuroblasts at the border with the antennal lobe eventually become incorporated into the antennal lobe itself and subsequently generate progeny which contribute to the neuroarchitecture of this deutocerebral structure (Boyan and Williams, 2000).

In re-analysing the neuroblast map of the protocerebrum, we used the same criteria as Bate (1976); Doe and Goodman (1985a) successfully applied to the neuromeres of the ventral nerve cord, and which have subsequently become the standard for all neuroblast analyses in the arthropods (e.g. Whittington et al., 1991, 1993; Broadus et al., 1995;

Doe and Skeath, 1996; Buescher et al., 2002; Harzsch, 2003). Beginning anterior-medially and moving posterior-laterally, this scheme allocated neuroblasts to one of seven rows, with a total of 95 neuroblasts in each protocerebral hemisphere (Fig. 2). The original study of Zacharias et al. (1993) identified 86 neuroblasts as belonging to the protocerebrum. The additional nine neuroblasts in the present study come largely from the most posterior row (red) bordering the antennal lobe, and which were previously deemed to be of deutocerebral origin (Fig. 2A and B). Molecular evidence such as that provided by *engrailed* expression has already led to one reinterpretation of this segment border (Boyan and Williams, 2000), and now has necessitated a further revision of those neuroblasts allocated to either protocerebrum or deutocerebrum (Fig. 2A and B).

It is obvious that the protocerebral rows we describe are not as neatly aligned as those in the ventral nerve cord (cf. Doe and Goodman, 1985a). Spaces are present which will eventually be filled by structures such as the mushroom bodies which only begin to develop after 50% of embryogenesis (Boyan et al., 1995a,b,c; Urbach et al., 2003a,b for Coleoptera). Our scheme must be understood as a first attempt to provide an individual identity for these protocerebral neuroblasts. Nevertheless, we arrive, coincidentally, at the same number of rows as is found in an embryonic neuromere of the ventral nerve cord, but with three times the total number of neuroblasts involved.

4.2. Lineages of brain neuroblasts related to central complex formation

Previous descriptions of neuroblast organization in the insect brain provided maps of neuroblast locations, but few detailed analysis of their lineages (Malzacher, 1968; Zacharias et al., 1993; Younossi-Hartenstein et al., 1996, 1997; Urbach and Technau, 2003; Urbach et al., 2003a,b). Such knowledge is fundamental if we are to establish how the progeny of a given neuroblast generate any of the four fibre tracts (w, x, y, z) of the central complex.

In this present study we have used immunocytochemical, dye injection and histological methods to provide the first detailed description of specific neuroblast lineages over a wide time window (20%) of embryonic development (Figs. 3 and 5). We thereby identified 4 protocerebral neuroblasts in each hemisphere (1-1, 2-1, 3-1, 4-1), which contribute progeny to the w, x, y and z tracts respectively (Figs. 4 and 5). We also identified a subset of cells from one of these lineages (the 4-1 cluster, Fig. 5C), which we know contribute axons to the z tract. Our data show that this tract is pioneered between 33 and 37% of embryogenesis. This is much earlier than we previously thought based on the arrival of axons at their target sites in the midbrain (50%, Boyan and Williams, 1997). Which cell provides the first axon of the tract, and how it finds its way into the midbrain, remain questions for a future study. The fact that diaphrase

staining reveals the presence of NO expressing axons in embryonic tracts of the central complex (Fig. 1C), and that NO is known to regulate the growth cones of pioneer fibres in the peripheral nervous system (Seidel and Bicker, 2002), offers one potential candidate molecule regulating axon guidance in the central complex.

4.3. Axon projections in the w, x, y, and z tracts are topologically ordered according to age

When the axonal projections of cells in the 4-1 cluster were examined, we found a clear relationship between axon position in the z tract and location of the associated cell body in the Z cluster (Fig. 6). This location could, in turn, be related to the age of the respective cell. The order in which a neuroblast generates its progeny has been shown to be highly stereotypic (Bate, 1976; Taghert et al., 1984; Doe and Goodman, 1985a,b; Whittington et al., 1991, 1993; Doe and Skeath, 1996). Further, the anatomical, electrophysiological and biochemical properties of neurones from a given lineage are related to their birthday (Goodman et al., 1980). It therefore comes as no surprise that our study should uncover an age-dependent topological organization within the 4-1 cell cluster and the tract (z) it generates (Fig. 6). Our data suggest that this organizational feature extends to the other tracts of the central complex as well (Fig. 7). If so, then temporal topology could provide the basis for the neuro-architectural organization of the repeating modules (w, x, y, z) of the central complex as we propose in our model (Fig. 8).

Our finding of a temporal based topology of cell body positions and axon projections in the central complex is not novel for the insect brain. Wegerhoff and Breidbach (1992) showed that modules of the central complex in *Tenebrio* are added incrementally over successive instars. Recently, Farris and Sinakevitch (2003) reported an age gradient among Kenyon cells of the developing mushroom body in the cockroach *Periplaneta americana*. Cells of different ages subsequently project axons in different layers of the calyx and pedunculus to the ventral and medial lobes. Similar age gradients are present in the cell clusters which derive from neuroblasts of the optic anlagen (Meinertzhagen, 1973). The medulla and lobula owe their extensive modular organization in part to finely tuned waves of cell production, cell differentiation and cell death in these cell clusters (Panov, 1960; Nordlander and Edwards, 1969). Taken together these studies suggest that time may represent a basic organizational principle regulating the fine neuro-architecture of a range of higher order association centres in insects. The molecular program regulating this topology in neuroblasts of the embryonic central complex awaits clarification.

Acknowledgements

We thank Dr Swidbert Ott for introduction to and

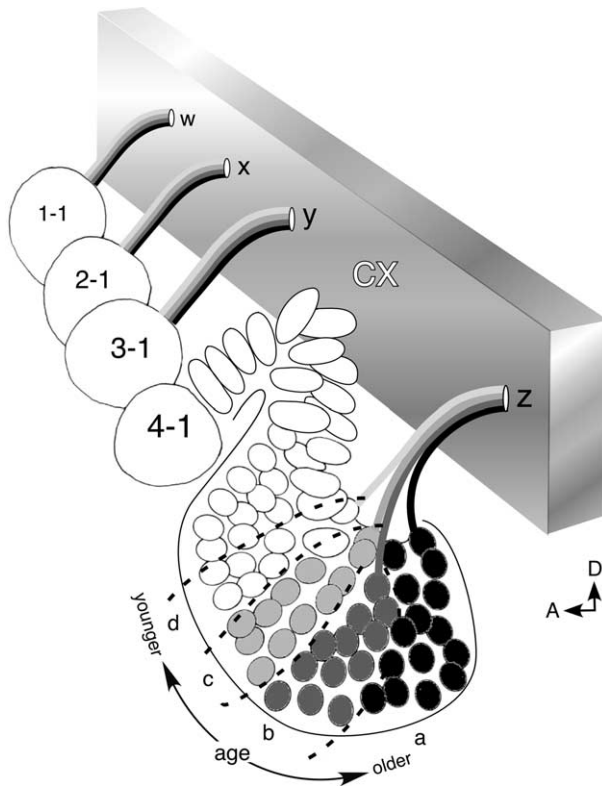


Fig. 8. Modular basis of tract formation in the central complex. Schematic summarizing the way regionalization based on age among the progeny of neuroblast 4-1 could serve as a model for tract formation in the central complex. The progeny of neuroblast 4-1 appear organized by age (different shadings), with the oldest (a) most distant from, and the youngest (d) closest to, their mother neuroblast. Axons project from cells in these regions into the z tract in an ordered manner reflecting this age-based regionalization. If this principle is applied to neuroblasts 1-1, 2-1, and 3-1, it could account for the repeating modules forming the w, x, y, and z tracts of the central complex.

assistance with the diaphorase histology, Dr Peter Ludwig for assistance with intracellular dye injection, and Eva Lodde for assistance with BrdU incorporation.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found at [10.1016/j.asd.2004.11.001](https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.11.001).

References

- Bate, C.M., 1976. Embryogenesis of an insect nervous system I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 35, 107–123.
- Bentley, D., Keshishian, H., Shankland, M., Toroian-Raymond, A., 1979. Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 54, 47–74.

- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., 1997. Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. *Development Genes and Evolution* 207, 317–329.
- Boyan, G., Williams, L., 2000. Building the antennal lobe: engrailed expression reveals a contribution from protocerebral neuroblasts in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Structure and Development* 29, 267–274.
- Boyan, G., Williams, L., 2002. A single cell analysis of engrailed expression in the early embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: ontogeny and identity of the secondary headspot cells. *Arthropod Structure and Development* 30, 207–218.
- Boyan, G., Williams, L., Meier, T., 1993. Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. *Journal of Comparative Neurology* 332, 358–377.
- Boyan, G.S., Therianos, S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1995a. Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. *Development* 121, 75–86.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1995b. Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. *Roux's Archives of Developmental Biology* 205, 45–53.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1995c. Morphogenetic reorganization of the brain during embryogenesis in the grasshopper. *Journal of Comparative Neurology* 361, 429–440.
- Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H., 1996. Embryogenesis of the Insect Brain: Formation of Proliferative Clusters, Cell Translocation, and Cortical Organization. *Proceedings XX International Congress of Entomology, Florence*, p. 197.
- Broadus, J., Skeath, J.B., Spana, E.P., Bossing, T., Technau, G., Doe, C.Q., 1995. New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mechanisms of Development* 53, 393–402.
- Buescher, M., Hing, F.S., Chia, W., 2002. Formation of neuroblasts in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster* is controlled by SoxNeuro. *Development* 129, 4193–4203.
- Bullock, T.H., Horridge, G.A., 1965. *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*, vol. 2. Freeman, San Francisco.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S., 1985a. Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Developmental Biology* 111, 193–205.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S., 1985b. Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Developmental Biology* 111, 206–219.
- Doe, C.Q., Skeath, J.B., 1996. Neurogenesis in the insect central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 18–24.
- Farris, S.M., Sinakevitch, I., 2003. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. *Arthropod Structure and Development* 32, 79–101.
- Goodman, C.S., Pearson, K.G., Spitzer, N.C., 1980. Electrical excitability: a spectrum of properties in the progeny of a single embryonic neuroblast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77, 1676–1680.
- Hanesch, U., Fischbach, K.-F., Heisenberg, M., 1989. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Research* 257, 343–366.
- Harzsch, S., 2003. Ontogeny of the ventral nerve cord in malacostracan crustaceans: a common plan for neuronal development in Crustacea, Hexapoda and other Arthropoda? *Arthropod Structure and Development* 32, 17–37.
- Homberg, U., 1985. Interneurons of the central complex in the bee brain (*Apis mellifera*, L.). *Journal of Insect Physiology* 31, 251–264.
- Homberg, U., 1987. Structure and functions of the central complex in insects, in: Gupta, A.P. (Ed.), *Arthropod Brain: its Evolution, Development, Structure, and Functions*. Wiley, New York, pp. 347–367.
- Homberg, U., 1991. Neuroarchitecture of the central complex in the brain

- of the locust *Schistocerca gregaria* and *S. americana* as revealed by serotonin immunocytochemistry. *Journal of Comparative Neurology* 303, 245–254.
- Homberg, U., 1994a. Flight-correlated activity changes in neurons of the lateral accessory lobes in the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Comparative Physiology A* 175, 597–610.
- Homberg, U., 1994b. Distribution of Neurotransmitters in the Insect Brain, *Progress in Zoology*, vol. 40. Fischer, New York.
- Homberg, U., 2002. Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microscopy Research and Technique* 56, 189–209.
- Homberg, U., 2004. In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91, 199–208.
- Homberg, U., Müller, M., Vitzthum, H., 1996. The Central Complex: Evidence for a Role in Polarized-Light Orientation. *Proceedings XX International Congress of Entomology*, Florence, p. 204.
- Homberg, U., Vitzthum, H., Müller, M., Binkle, U., 1999. Immunocytochemistry of GABA in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*: identification of immunoreactive neurons and colocalization with neuropeptides. *Journal of Comparative Neurology* 409, 495–507.
- Howse, P.E., Williams, J.L.D., 1969. The Brains of Social Insects in Relation to Behaviour. *Proceedings VI Congress of the International Union for the Study of Social Insects*, Bern, pp. 59–64.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., Yamamoto, D., 1997. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761–771.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 1991. *Principles of Neural Science*, 3rd edition. Elsevier, New York.
- Leise, E.M., 1990. Modular construction of nervous systems: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates. *Brain Research Reviews* 15, 1–23.
- Loesel, R., Nässel, D.R., Strausfeld, N.J., 2002. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods. *Arthropod Structure and Development* 31, 77–91.
- Ludwig, P., Williams, L., Boyan, G., 2002. The pars intercerebralis of the locust brain: a developmental and comparative study. *Microscopy Research and Technique* 56, 174–188.
- Malzacher, P., 1968. Die Embryogenese des Gehirns paurometaboler Insekten Untersuchungen an *Carausius morosus* und *Periplaneta americana*. *Zoologie und Morphologie der Tiere* 62, 103–161.
- Meinertzhagen, I.A., 1973. Compound eye and optic lobe development, in: Young, D. (Ed.), *Developmental Neurobiology of Arthropods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 51–104.
- Meinertzhagen, I.A., Emsley, J.G., Sun, X.J., 1998. Developmental anatomy of the *Drosophila* brain: neuroanatomy is gene expression. *Journal of Comparative Neurology* 402, 1–9.
- Mizunami, M., Iwasaki, M., Nishikawa, M., Okada, R., 1997. Modular structures in the mushroom body of the cockroach. *Neuroscience Letters* 229, 153–156.
- Müller, M., Homberg, U., Kühn, A., 1997. Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Cell Tissue Research* 288, 159–176.
- Nordlander, R.H., Edwards, J.S., 1969. Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus* L. II. The optic lobes. *Wilhelm Roux Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 163, 197–200.
- O'Shea, M., Colbert, R., Williams, L., Dunn, S., 1998. Nitric oxide compartments in the mushroom bodies of the locust brain. *Neuroreport* 9, 333–336.
- Panov, A.A., 1960. The structure of the insect brain during successive stages of postembryonic development. III. Optic lobes. *Entomological Review* 39, 55–68.
- Patel, N.H., Kornberg, T.B., Goodman, C.S., 1989. Expression of engrailed during segmentation in grasshopper and crayfish. *Development* 107, 201–212.
- Renn, S.C.N., Armstrong, J.D., Yang, M., Wang, Z., An, X., Kaiser, K., Taghert, P.H., 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *Journal of Neurobiology* 41, 189–207.
- Seidel, C., Bicker, G., 2002. Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathways in the brain of the embryonic grasshopper. *Developmental Brain Research* 138, 71–79.
- Strausfeld, N.J., 1976. *Atlas of an Insect Brain*. Springer, Berlin.
- Strausfeld, N.J., 1996. Ancient Structures in Modern Brains: Insect Phylogeny from the Nervous System. *Proceedings XX International Congress of Entomology*, Florence, p. 197.
- Strausfeld, N.J., 1998. Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain, Behavior and Evolution* 52, 186–206.
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., Ito, K., 1998. Evolution, discovery, and interpretation of arthropod mushroom bodies. *Learning and Memory* 5, 11–37.
- Strauss, R., 1996. The Central Complex is a Higher Centre for Locomotor Control in Insects. Evidence from new *Drosophila melanogaster* Mutants (Diptera: Drosophilidae). *Proceedings XX International Congress of Entomology*, Florence, p. 198.
- Strauss, R., 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotory behaviour. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 633–638.
- Strauss, R., Heisenberg, M., 1993. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *Journal of Neuroscience* 13, 1852–1861.
- Strauss, R., Hanesch, U., Kinkelin, M., Wolf, R., Heisenberg, M., 1992. No-bridge of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex. *Journal of Neurogenetics* 8, 125–155.
- Taghert, P.H., Doe, C.Q., Goodman, C.S., 1984. Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. *Nature* 307, 163–165.
- Tettamanti, M., Armstrong, J.D., Endo, K., Yang, M.Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K., Reichert, H., 1997. Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and memory. *Development, Genes and Evolution* 207, 242–252.
- Urbach, R., Technau, G.M., 2003. Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Structure and Development* 32, 103–123.
- Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G.M., 2003a. The pattern of neuroblast formation, mitotic domains, and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130, 3589–3606.
- Urbach, R., Technau, G.M., Breidbach, O., 2003b. Spatial and temporal pattern of neuroblasts, proliferation, and Engrailed expression during early brain development in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Arthropod Structure and Development* 32, 125–140.
- Vitzthum, H., Homberg, U., Agricola, H., 1996. Distribution of Dip-Allotatin I-like immunoreactivity in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* with detailed analysis of immunostaining in the central complex. *Journal of Comparative Neurology* 369, 419–437.
- Vitzthum, H., Müller, M., Homberg, U., 2002. Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *Journal of Neuroscience* 22, 1114–1125.
- Wegerhoff, R., Breidbach, O., 1992. Structure and development of the larval central complex in a holometabolous insect, the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell Tissue Research* 268, 341–358.
- Wegerhoff, R., Breidbach, O., Lobemeier, M., 1996. Development of locust tachykinin immunopositive neurons in the central complex of the beetle *Tenebrio molitor*. *Journal of Comparative Neurology* 375, 157–166.
- Whittington, P.M., Meier, T., King, P., 1991. Segmentation, neurogenesis and formation of early axonal pathways in the centipede, *Ethmostigmus rubripes* (Brandt). *Roux's Archives of Developmental Biology* 199, 349–363.
- Whittington, P.M., Leach, D., Sandeman, R., 1993. Evolutionary change in neural development within arthropods: axogenesis in the embryos of two crustaceans. *Development* 118, 449–461.

- Williams, J.L.D., 1975. Anatomical studies of the insect central nervous system: a ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). *Journal of Zoology London* 176, 67–86.
- Younossi-Hartenstein, A., Nassif, C., Hartenstein, V., 1996. Early neurogenesis in the *Drosophila* brain. *Journal of Comparative Neurology* 370, 313–329.
- Younossi-Hartenstein, A., Green, P., Liaw, G.J., Rudolph, K., Lengyel, J., Hartenstein, V., 1997. Control of early neurogenesis of the *Drosophila* brain by the head gap genes *tlx*, *otd*, *ems* and *btd*. *Developmental Biology* 182, 270–283.
- Zacharias, D., Williams, J.L.D., Meier, T., Reichert, H., 1993. Neurogenesis in the insect brain: cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development* 118, 941–955.

Developmental Expression of Neuromodulators in the Central Complex of the Grasshopper *Schistocerca gregaria*

Zsafia Herbert,¹ Sandra Rauser,² Leslie Williams,¹ Neval Kapan,¹ Michaela Güntner,¹ Axel Walch,² and George Boyan^{1*}

¹Developmental Neurobiology Group, Biocenter, Ludwig-Maximilians-Universität, 82152 Martinsried, Germany

²Institute of Pathology, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, 85764 Neuherberg, Germany

ABSTRACT The central complex is a major integrative region within the insect brain with demonstrated roles in spatial orientation, the regulation of locomotor behavior, and sound production. In the hemimetabolous grasshopper, the central complex comprises the protocerebral bridge, central body (CB), ellipsoid body, noduli, and accessory lobes, and this modular organization develops entirely during embryogenesis. From a biochemical perspective, a range of neuroactive substances has been demonstrated in these modules of the adult central complex, but little is known about their developmental expression. In this study, we use matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry on single brain slices to confirm the presence of several peptide families (tachykinin, allatostatin, periviscerokinin/pyrokinin, FLRFamide, and neuropeptide F) in the adult central complex and then use immunohistochemistry and histology to examine their developmental expression, together with that of the indolamin serotonin, and the endogenous messenger nitric oxide (NO; via its synthesizing enzyme). We find that each neuromodulator is expressed according to a unique, stereotypic, pattern within the various modules making up the central complex. Neuropeptides such as tachykinin (55%) and allatostatin (65%), and the NO-synthesizing enzyme diaphorase (70%), are expressed earlier during embryonic development than the biogenic amine serotonin (80%), whereas periviscerokinin-like peptides and FLRFamide-like peptides begin to be expressed only postembryonically. Within the CB, these neuroactive substances are present in tangential projection neurons before they appear in columnar neurons. There is also no colocalization of serotonin-positive and peptide-positive projections up to the third larval instar during development, consistent with the clear dorsoventral layering of the neuropil we observe. Our results provide the first neurochemical fingerprint of the developing central complex in an hemimetabolous insect. *J. Morphol.* 271:1509–1526, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: insect; embryo; midbrain; peptides; transmitters

INTRODUCTION

The central complex is a group of neuropils situated at the midline between the two protocerebral hemispheres of the insect brain. In all Diptera (Power, 1943; Strausfeld, 1976; Hanesch et al.,

1989), Hymenoptera (Mobbs, 1985), Coleoptera (Wegerhoff and Breidbach, 1992), and Orthoptera (Williams, 1975; Müller et al., 1997) examined thus far, the central complex is subdivided into five neuropils: the protocerebral bridge (PB), the central body (CB) (also termed the CB upper division in Heinze and Homberg, 2008), the ellipsoid body (EB) (also termed the CB lower division in Heinze and Homberg, 2008), the paired noduli (N), and the accessory lobes (lateral and median) (Williams, 1975). A host of studies confirm the key role these various modules play in the integration of sensory input such as polarized vision for spatial orientation, motor planning, goal-directed behaviors, sound production, and stress response behavior (Huber, 1960; Strauss and Heisenberg, 1993; Ilius et al., 1994; Heinrich, 2002; Strauss, 2002; Popov et al., 2003; Heinze and Homberg, 2007; Neckameyer and Matsuo, 2008; Neuser et al., 2008; Weinrich et al., 2008).

Characteristic of the CB in acridids is its columnar organization, while the CB and EB additionally contain horizontal layers of projections (see Williams, 1975; Heinze and Homberg, 2008). Studies at the cellular level (for review, see Heinze and Homberg, 2008) show that three classes of neurons constitute the neuroarchitecture of the central complex: a) columnar neurons connect single columns of the PB and/or the CB with the lateral accessory lobes (LALs) or the noduli. In grasshoppers, their cell bodies are located in the pars intercerebralis (PI) of the protocerebrum, and their

Contract grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft; Grant number: BO-1434/3-5.

*Correspondence to: Prof. Dr. George Boyan, Developmental Neurobiology Group, Biocenter, Ludwig-Maximilians-Universität, Grosshadernerstrasse 2, 82152 Martinsried, Germany.
E-mail: george.boyan@lmu.de

Received 11 May 2010; Revised 9 June 2010;
Accepted 18 June 2010

Published online 19 October 2010 in
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/jmor.10895

fibers project between the PB and CB via four conspicuous fascicles termed the w-, x-, y-, and z tracts; b) tangential neurons innervate single layers of the PB, CB, or EB and provide connections with diverse brain areas such as lateral protocerebrum; and c) pontine neurons are intrinsic elements that connect specific columns and layers within the CB.

Although the neuroarchitecture of the insect central complex has been shown via genetic dissection to be pivotal to its ability to organize complex behavior (Strauss, 2002), its development is still not very well understood. In hemimetabolous insects such as the grasshopper *Schistocerca gregaria*, the central complex is built during the course of embryogenesis (Boyan and Williams, 1997; Boyan et al., 2008a,b; Williams and Boyan, 2008). By contrast, that of holometabolites such as beetles (*Tenebrio molitor*) forms progressively during postembryonic larval stages (Wegerhof and Breidbach, 1992) or forms during pupal enclosure (*Drosophila*) and as such can be considered essentially an adult structure (Renn et al., 1999). Of its various neuropils, the columnar organization of the CX has been described in most detail from a developmental perspective (Boyan et al., 2008b). In early embryogenesis of the grasshopper, four neuroblasts (the so-called W, X, Y, and Z neuroblasts) from each cerebral hemisphere of the brain generate the bilateral W, X, Y, and Z lineages of the PI (Williams et al., 2005). The first progeny of these lineages pioneers the w, x, y, and z tracts and subsequently fasciculates with the primary embryonic commissure of the brain (Williams and Boyan, 2008). Before 55% of the development, the commissural organization of the brain resembles that of the ventral nerve cord (VNC). Subsequently, via a process known as fascicle switching, a subset of commissural fibers originating in the W, X, Y, and Z lineages generates the chiasmal, columnar neuroarchitecture of the CB which by 70% of embryogenesis already has an adult appearance (Boyan et al., 2008b).

In addition to the neuroanatomical, genetic, and developmental aspects, a functional analysis of the central complex also requires an understanding of its neurochemical architecture, and considerable data are now available detailing the expression patterns of a range of neuromodulatory substances in the midbrain of adult insects (Nässel, 1993, 1994, 1999, 2002; Nässel et al., 1995, 1998; Homberg, 2002). Knowledge about the development of this neurochemical architecture could provide valuable insights into the behavioral role the central complex plays at various critical stages such as hatching, moulting, and pupation, each of which will involve the upregulation or downregulation of specific molecules. Again, although the adult expression patterns of several neuropeptides and transmitters of the central complex have been identified, little is known about their development

in the embryo (Seidel and Bicker, 1996, 2000, 2002; Boyan et al., 2008a, 2010).

We have therefore chosen to investigate the temporal expression pattern of several neuropeptide families: locustatachykinins (LomTK), allatostatins (AST), periviscerokinin/pyrokinine (PVK/PK), and FLRFamide, as well as the biogenic monoamine serotonin, and the endogenous messenger nitric oxide (NO) via its synthesizing enzyme diaphorase, in the embryonic and early postembryonic central complex of the grasshopper *S. gregaria*. Except for PVK/PK, the expression of these substances is well characterized in the adult CX (Homberg, 1991; Vitzthum et al., 1996; Müller et al., 1997; Vitzthum and Homberg, 1998; Homberg et al., 1999; Kurylas et al., 2005). At each developmental stage, we compare the expression patterns with the central complex neuroarchitecture present so as to provide a database for future functional studies. In the absence of suitable antibodies, we also use matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry (MALDI-IMS) to reveal the members of peptide families not otherwise identifiable in the central complex. Our results provide the first neurochemical fingerprint of the developing central complex in an hemimetabolous insect.

MATERIALS AND METHODS

Animals

S. gregaria eggs from our own crowded culture were incubated at 30°C in moist aerated containers with a 12/12-h light/dark regime. Embryos were staged at time intervals equal to percentage of embryogenesis as described by Bentley et al. (1979). All experiments were performed in Munich/Germany in 2009, according to the guidelines for animal welfare established by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Immunocytochemistry

Tissue preparation. All immunocytochemical experiments were performed on brain slices, which were prepared as follows. Staged embryos were dissected out of the egg in ice-cold 0.1 mol l⁻¹ phosphate-buffered saline (PBS) and freed from embryonic membranes. For instars and adults, the animal was anesthetized by cooling, and the brain was dissected from the head capsule into the cold buffer. Prepared tissues were immersion fixed in 3.7% paraformaldehyde in 0.1 mol l⁻¹ PBS overnight at 4°C. Brains or whole embryonic heads were embedded in 5% agarose/PBS at 55–60°C, the solution allowed to cool, and the resulting block serially sectioned on a Vibratome (Leica) at 40–50 µm thickness. Sections were collected in 0.1 mol l⁻¹ PBS, freed from agarose, and positioned onto Superfrost® plus (Menzel-Gläser) microscope slides. Immunocytochemistry was performed directly on this sectioned material. We investigated at least five brains for each neuroactive substance at each developmental stage.

Primary antibodies. The polyclonal rabbit locustatachykinin antibody (K1-50820091) (gift from H. Agricola, FSU-Jena, Germany) was diluted 1:1,000 in preincubation medium. The antibody used is specific against common C terminals of *Locusta migratoria* (Lom)-TK I and LomTK II (-GFYGVGR). Its specificity has been tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with synthetic LomTK I and II and callitachykinins I and II as antigens. The antiserum cross reacts with all tachykinins (Nässel et al., 1995). The polyclonal rabbit antibody

against *Diploptera punctata* (Dip)-allatostatin I (AST) was used at a dilution of 1:5,000 in the preincubation medium. Synthetic *D. punctata* allatostatin I (APSGAQLRYGFLamide) was used for immunization of rabbits. The specificity of the Dip-allatostatin I antiserum was characterized by a competitive ELISA for Dip-AST I–IV. With a noncompetitive ELISA, cross reactivity between the Dip-allatostatin I antiserum and the peptides corazonin, CCAP, FMRFamide, leucomyo-suppressin, locustatachynin I, perisulfakinin, preadsorption of the diluted antiserum with 120 $\mu\text{mol l}^{-1}$ synthetic FMRFamide (Bachem, Bubendorf, Switzerland) abolished all immunostaining, whereas preincubation with 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Dip-allatostatin I had no effect on FLRFamide immunostaining (Homberg et al., 1999). Because of sequence similarities, we cannot exclude the possibility of a cross reaction between this antibody and the more recently discovered *Schistocerca* neuropeptide F (Clynen et al., 2009).

To stain peptides of the locust periviscerokin (PVK) and pyrokinin (PK) peptide families, we used the primary antiserum against *Periplaneta americana* (Pea)-PVK II produced by Eckert (described and characterized in Eckert et al., 2002). Rabbits were immunized with thyroglobulin–glutaraldehyde conjugates of Pea-PVK II (GSSSLISMPRV-NH₂) as described by Eckert et al. (1999). We used unpurified antibody, which is specific against (P)RXamide and therefore is suitable for labeling both *Schistocerca* PKs, PVKs and MT-2 (for sequences, see Clynen et al., 2003a). Additionally, in our mass spectrometry experiments, we identified the respective antigens for all the antisera used in the *Schistocerca* brain slices (for protocol, see below). After a preincubation (2 h, room temperature) in 2% normal goat serum in 0.1% Triton-X-100 in 0.1 mol l^{-1} PBS (PBS-TX), sections were incubated for 12 h in the primary antibody at 4°C in a humid chamber.

Single staining. After exposure to the primary antibody, embryos were washed in 0.1 mol l^{-1} PBS-TX for 4 h before being transferred to a preincubation medium containing the appropriate secondary antibody. Incubation with secondary antibody was for 12 h at 4°C in a humid chamber in the dark. Both goat-anti-mouse IgG conjugated with Cy3 (Dianova) and goat-anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-488 (Invitrogen) were diluted in the preincubation medium at 1:200 and were used as appropriate. Sections were then washed overnight in 0.1 mol l^{-1} PBS at 4°C in the dark, mounted in Vectashield® (Vector laboratories) on slides, and coverslipped for confocal microscopy.

Double staining. We performed double labeling for serotonin with each of the peptides described above. After the serotonin immunostaining, sections were washed in 0.1 mol l^{-1} PBS-TX for 4 h before being transferred to the antisera against the peptides. The immunostaining was performed as above. The primary antibody against serotonin was raised in mouse; the antisera against the peptides were raised in rabbit, thus minimizing the possibility of any cross reactivity between the secondary antibodies.

Further controls for the specificity of antibodies used involved: a) application of the relevant secondary antibody in the absence of the primary antibody (in no case was a staining pattern observed) and b) comparison of the known adult staining pattern with the originally published data (in all cases, an identical staining pattern to that first description was observed). Further confirmation of the presence of these peptides in the region of the CB involved MALDI-IMS (see below).

NADPH-Diaphorase Histochemistry

The presence of NO in central complex neurons was studied using the well-documented nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase histochemical method (see

Seidel and Bicker, 2002; Kurylas et al., 2005). Staged embryos were dissected from their eggs in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline (140 mmol l^{-1} NaCl, 5 mmol l^{-1} KCl, 5 mmol l^{-1} CaCl₂, 1 mmol l^{-1} MgCl₂, 100 mmol l^{-1} sucrose, 20 mmol l^{-1} glucose, and 5 mmol l^{-1} HEPES, pH 7.2) and subsequently fixed in ice-cold methanol/37% formaldehyde (9:1 by volume) for between 30 and 60 min. Embryos were then lightly rinsed in several changes of 0.1 mol l^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer, pH 7.2, on ice and washed again thoroughly in Tris-Tx (0.1 mol l^{-1} Tris, pH 8.0, 0.2% Triton X-100). They were immersed in a staining solution of 0.2 mmol l^{-1} nitroblue tetrazolium and 0.2 mmol l^{-1} NADPH in Tris-Tx at 48°C, in the dark, for 18 h with gentle shaking. Stained tissue was inspected visually, and if necessary, further incubation was undertaken in a fresh staining solution at room temperature and in the dark. When adequately stained, the embryos were washed well in distilled water and cryoprotected by infiltration with an ice-cold solution of 20% sucrose in 0.1 mol l^{-1} phosphate buffer and 0.005% sodium azide for 2–3 h until they sank. Embryos were then embedded in Jung tissue freezing medium (Leica, Germany) in brass-based moulds and quenched in liquid nitrogen. The frozen blocks were mounted on cryostat chucks and cut on a cryostat at 30- μm thickness. Frozen sections were thaw-mounted on chrome alum/gelatin slides and air dried at room temperature. The slides were then washed thoroughly in distilled water and cover slipped under glycerol–gelatin jelly.

Imaging

Confocal microscopy. Optical sections of brains from slice preparations were acquired with a Leica TCS SP1 confocal laser scanning microscope equipped with $\times 25$ and $\times 63$ oil immersion objectives. Fluorochromes were visualized using an argon laser with excitation wavelengths of 488 nm (for Alexa-488) and 535 nm (for Cy3). Confocal images were processed using public domain software (ImageJ).

Light and fluorescence microscopy. For light and fluorescence microscopy, preparations were viewed under a Leica DM5000B microscope. Images were captured with a 1.3 MP color CCD camera (Scion Corp.) using Scion VisiCapture® software.

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry

Brains were removed from the head and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were cut on a cryostat without embedding and positioned on conductive indium tin oxide-coated glass slides (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Sections were then briefly immersed in 70 and 100% ethanol, dried under vacuum, and directly covered with matrix. The MALDI matrix was applied using the ImagePrep station (Bruker). The matrix comprised α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, Sigma, Taufkirchen, Germany) at a concentration of 7 mg/ml in a 50:50 (v/v) water/acetonitrile mixture with 0.2% trifluoroacetic acid (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The MALDI measurement was performed on an Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker) using FlexControl 3.0 and FlexImaging 2.1 software packages (Bruker) and carried out in reflector mode in a mass range of 500–6,000 Da with a sampling rate of 0.1 GS/s. The laser spot diameter for MALDI-IMS was set to 50 μm , and a total of 200 laser shots were measured per position at constant laser power.

Neuraxes

Neuroarchitecture is described with respect to the neuraxis and not the body axis. The front of the brain (in the head) is defined as being neurally ventral, the top of the brain as neurally anterior, the back of the brain as neurally dorsal, and the base of the brain as neurally posterior. Planes of section are with respect to the neuraxis.

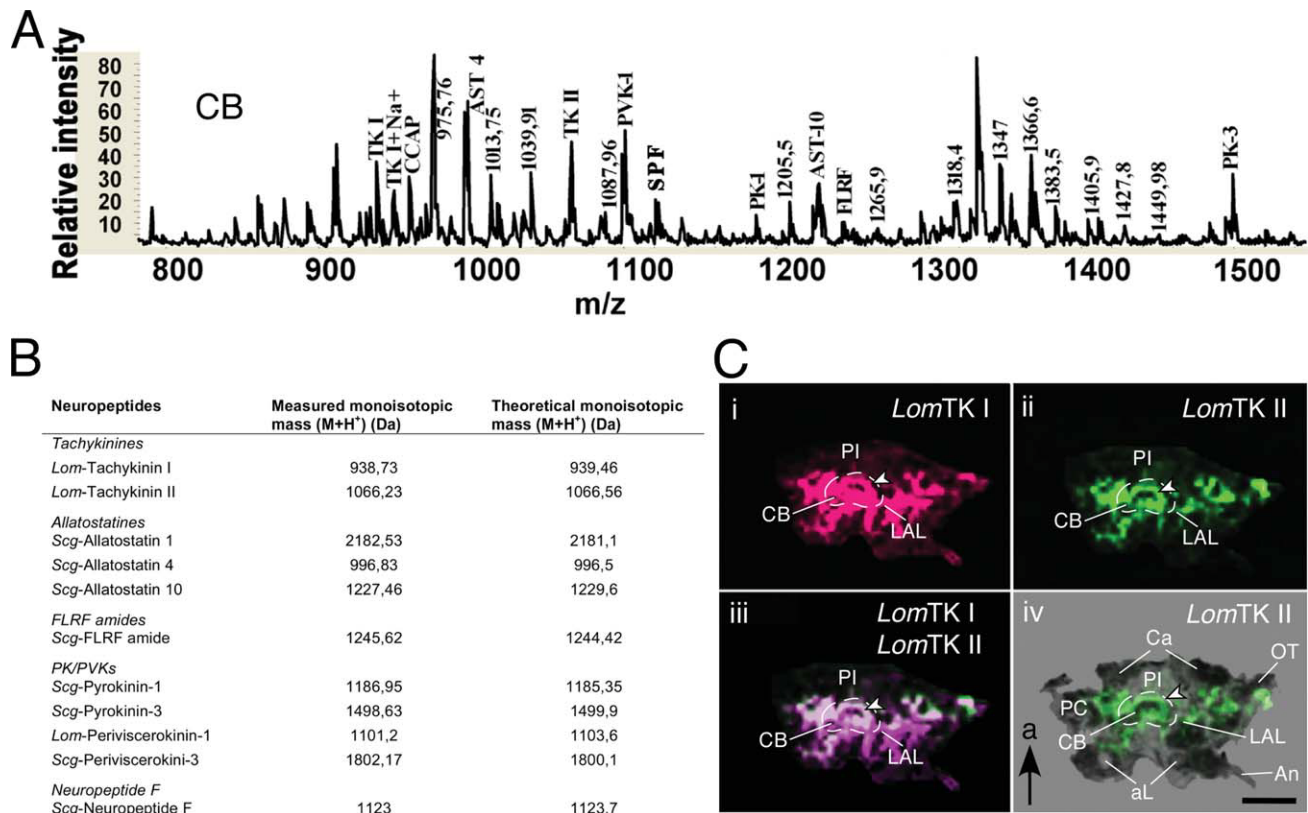


Fig. 1. Direct MALDI-IMS profiling of the locust CB. **A**: Spectrum of neuropeptides with masses between 800 and 1,500 Da localized in the central body (CB) of one 8- μ m brain slice. Unlabeled peaks are also present in the brain sheath. **B**: Table shows neuropeptides present in the CB and identified via their molecular masses. These data confirm that all the neuropeptide families (tachykinins, allatostatins, FLRFamides, and PK/PVKs) investigated via immunocytochemistry, as well as a member of the neuro-peptide F family (SPF in A above), are expressed in this brain region. **C**: Maps of LomTK I (i) and II (ii) expression in a brain slice as revealed by MALDI-TOF imaging. Central body is outlined (dashed white). The strongest LomTK signal is found in layer Ib of the central body (white arrowheads in i–iv). (iii) Superposition of the images in i and ii illustrates the similar distribution pattern of these two peptides (white color represents colocalization). (iv) Superposition of the MALDI-IMS data for LomTK II onto the microscopical image of the section reveals the distribution of this peptide in identified brain regions. Arrow (a) points to anterior. aL, antennal lobe; An, antenna; Ca, calyx of mushroom body; PC, protocerebrum; PI, pars intercerebralis; LAL, lateral accessory lobe; OT, optic tract. Scale bar: 250 μ m.

RESULTS

Mass Spectrometric Identification of Neuropeptides in the Brain

The MALDI-TOF imaging technique as applied to single slices enabled us to assign peptides to specific brain regions of the adult grasshopper. We detected 62 peptide peaks in the mass range from 800 to 5,000 Da, and 35 of these peptide masses are represented in the CX (Fig. 1A). Based on their masses, we were able to identify 11 known neuro-peptides from five neuropeptide families in the CB alone (Fig. 1B). The *Lom*-tachykinins I and II belong to the tachykinin family. *Scg*-allatostatin 1, 4, and 10 belong to the allatostatins. *Scg*-FLRFa-mide belongs to the FLRF amides. *Scg*-pyrokinnin-1, -3, *Lom*-periviscerokinin-1, and *Scg*-periviscerokinin-3 belong to the PK/PVK peptide families, and *Scg*-neuropeptide F (SPF) belongs to the neuro-peptide F family.

We were subsequently able to map the peptide peaks associated with LomTK I and LomTK II above

to adult brain sections (Fig. 1C). Our mapping shows that LomTKI (Fig. 1Ci) and LomTKII (Fig. 1Cii) have very similar distributions in the PC and mid-brain, with the strongest signal in the CB in each case localizing to layer Ib. Overlays of LomTK I and LomTKII maps confirm extensive colocalization of these peptides within the CB. Superposition of a LomTKII map onto an image of a brain slice (Fig. 1Civ) reveals an intense signal in the CB and neighboring regions of the PC as well as in the optic tract (OT). The calyces (Ca) of the mushroom bodies, by contrast, are devoid of signal, as are the antennal lobes (aL) and antennal nerve (An).

Developmental Pattern of Neuropeptide Immunoreactivity in the CX

The developmental expression of the LomTK, AST, PVK/PK, and FLRFamide neuropeptide families, as well as the biogenic amine serotonin, and

the gaseous messenger NO were investigated during embryonic development of the central complex.

Tachykinin (LomTK) Immunoreactivity

The adult central complex is densely innervated by LomTK immunoreactive neurons with processes in most of its subdivisions. Vitzthum and Homberg (1998) distinguished six distinct types of LomTK immunoreactive neurons with ramifications in the central complex can be distinguished: four columnar neuron groups (LTC I–IV) and two tangential neuron groups (LTT I–II). The LTC I cells are located anteriorly in the PI, project into the columnar tracts of the CB, and give rise to arborizations in the PB, EB, and the lateral triangle (LT) of the LAL. LTC II neurons are also located anterior to the bridge and project via the columnar tracts arborize in the PB and LT of LAL. The columnar LTC III cell group is composed of eight large and 16 small neurons anterior to the PB with arborizations here and in the layers I and II of the CB. LTC IV neurons project into eight large fibers in the posterior (ventral in Heinze und Homberg, 2008) groove and arborize in CB layers I and IIa. The tangential LTT I neurons located in the inferior median PC project to LAL to ramify in the LT. They then project through the isthmus tract to the EB. The LTT II are posterior PI neurons, which richly arborize in the PB, terminating in the posterior median protocerebrum of the contralateral brain (Vitzthum and Homberg, 1998).

LomTK immunoreactivity in the CX was first detected at 50% of embryogenesis in tangential neurons of the developing LALs. These neurons have their terminals in the area of the EB, posterior to the future CB (Fig. 2A). The pattern is consistent with these fibers belonging to the tangential LTT I neurons described by Vitzthum and Homberg (1998) in adults. No staining could be detected in the location of the future CB itself. Fibers within fascicles of the anterior commissure were also immunoreactive; however, it was not possible to unequivocally assign these to the PB. At 60% of development, the arborization of LomTK immunoreactive fibers is more pronounced. At 60% of development, an additional tangential projection system begins to express LomTK. We have identified these projections as belonging to the LTTII of the adult. The stained structures observed in the LALs colocalize to the adult LT and isthmus tract. At this stage, there is also a relatively weak LomTK immunostaining in the PB. Further, LomTK-positive projections are seen posterior to the bridge (Fig. 2B), but these do not belong to the CX.

LomTK immunoreactivity in columnar neurons and their projections was first observed at 70% of development (Fig. 2C,D). Strong immunoreactivity was present in the PB, the w, x, y, and z tracts,

the columnar fibers of the CB, and the EB. LomTK-positive arborizations are present in the anterior part of layer Ib of the CB (Fig. 2D). The projection is consistent with the LTC I and II neurons from the adult. At 80% of development, LomTK immunoreactivity is stronger and reveals an expansion of the arborizations in the CB. Furthermore, LomTK immunoreactive branches appear in the median part of the accessory lobes and in the posterior part of the noduli (Fig. 2E,F). This immunoreactivity subsequently becomes more intense (especially in the EB), but the overall pattern does not change (Fig. 2G).

In early postembryonic stages, additional strong immunoreactive arborizations originating from a different columnar cell group, the LTC III appear in layers I and II of the CB and also in the posterior groove indicating LTC expression in LTC IV neurons. This immunoreactive pattern is essentially that of the adult (Fig. 2H,I).

Allatostatin Immunoreactivity

The AST immunoreactive pattern for the adult *Schistocerca* CX has been described in detail by Vitzthum et al. (1996). Briefly, two columnar and four groups of tangential projection neurons innervate most parts of the CX. The processes of the first tangential neurons penetrate the LALs and after giving off side branches in the isthmus between the LALs and CB, they arborize in the IIa layer of the CB. The second tangential neuron group runs through the LALs and innervates the median olive. Their processes terminate with rich arborizations in layer IIb of the CB and in the most anterior layer of the EB. Most of the EB remains unstained. The third tangential neuron group projects anterior to the LALs, to the CB and arborizes here in the Ib and IIb layers. The fourth type projects in a similar way to the LTC II cells. These neurons end in the posterior optic tubercle and in the PB of the CX. The processes of the first columnar neuron group arborize densely in the PB and then project to the CB via the w, x, y, and z tracts. These processes build staves in the Ia and Ib CB layers and arborize profusely in the same layers. The terminations of these neurons were located in the LALs. The projection of the second columnar neuron group also reaches the CB via the w, x, y, and z tracts and forms staves and arborizations in layer III of the CB (see Fig. 3F) and in the paired noduli (not shown) (Vitzthum et al., 1996).

Allatostatin expression in the CX first appears in tangential projection neurons at the 60–65% stage. Based on their morphology and location, these first AST immunoreactive fibers are likely to be projections of AST 1 neurons. Allatostatin immunoreactivity alone does not delimit the CB and LALs at this stage, and there is no AST immuno-

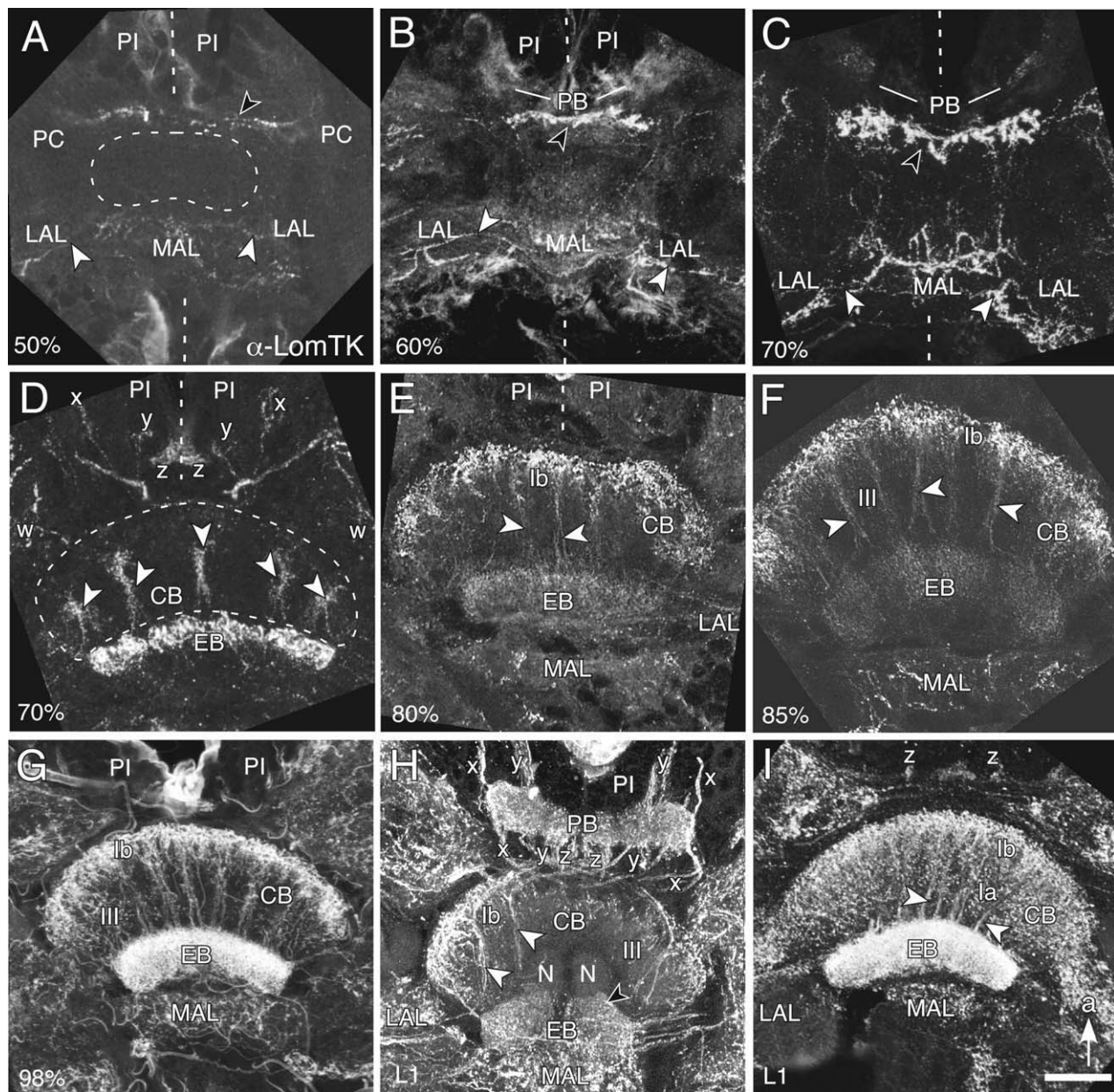


Fig. 2. Confocal images of brain slices reveal locustatachykinin (LomTK I,II) immunoreactivity during development of the central complex. **A:** 50% of embryogenesis. LomTK immunoreactivity is confined to the median accessory lobe (MAL), the bilateral lateral accessory lobe (LAL) regions (white arrowheads), and a bilateral projection (black arrowhead) just posterior to the protocerebral bridge (PB). The future location of the central body (CB) is outlined (dashed white), as is the brain midline (dashed white lines). **B:** 60% of embryogenesis. LomTK immunoreactivity is still restricted to the MAL, the bilateral LAL regions (white arrowheads), and the median region (black arrowhead) just posterior to the PB, which shows weak staining. **C:** 70% of embryogenesis. LomTK immunoreactivity has expanded in the midline region (black arrowhead) posterior to the PB, in the LALs (white arrowheads). Intensely stained fibers traverse the MAL. **D:** 70% of embryogenesis but more ventral in the brain than "C" above. Immunoreactive projections from the w, x, y, and z tract system enter the CB, where a columnar organization (white arrowheads) is apparent. Strong immunoreactivity is found in the ellipsoid body (EB). **E:** 80% of embryogenesis. Arborizations within the CB (Ib) are immunoreactive in addition to the columns (white arrowheads). Immunostaining is present in the MAL and LAL. **F:** 85% of embryogenesis. Immunoreactivity is prominent in Ib, III and columnar (white arrowheads) regions of the CB, in the EB and MAL. **G:** 98% of embryogenesis. LomTK staining is strong in Ib, III and columnar regions of the CB, in the EB and MAL. **H, I:** First post-embryonic instar (L1). The w, x, y, and z tract system, the PB, CB (Ia,b; II; III), EB, MAL, and LAL are prominently LomTK immunoreactive. Columnar fibers (white arrowheads) and the posterior parts of the noduli (N) are also immunoreactive (black arrowhead in H). PC, protocerebrum; PI, pars intercerebralis. Arrow indicates anterior (a) in this and other figures unless otherwise stated. Scale bar represents 25 μ m in A, 30 μ m in B, 35 μ m in C, D, 40 μ m in E, F, and 50 μ m in G–I.

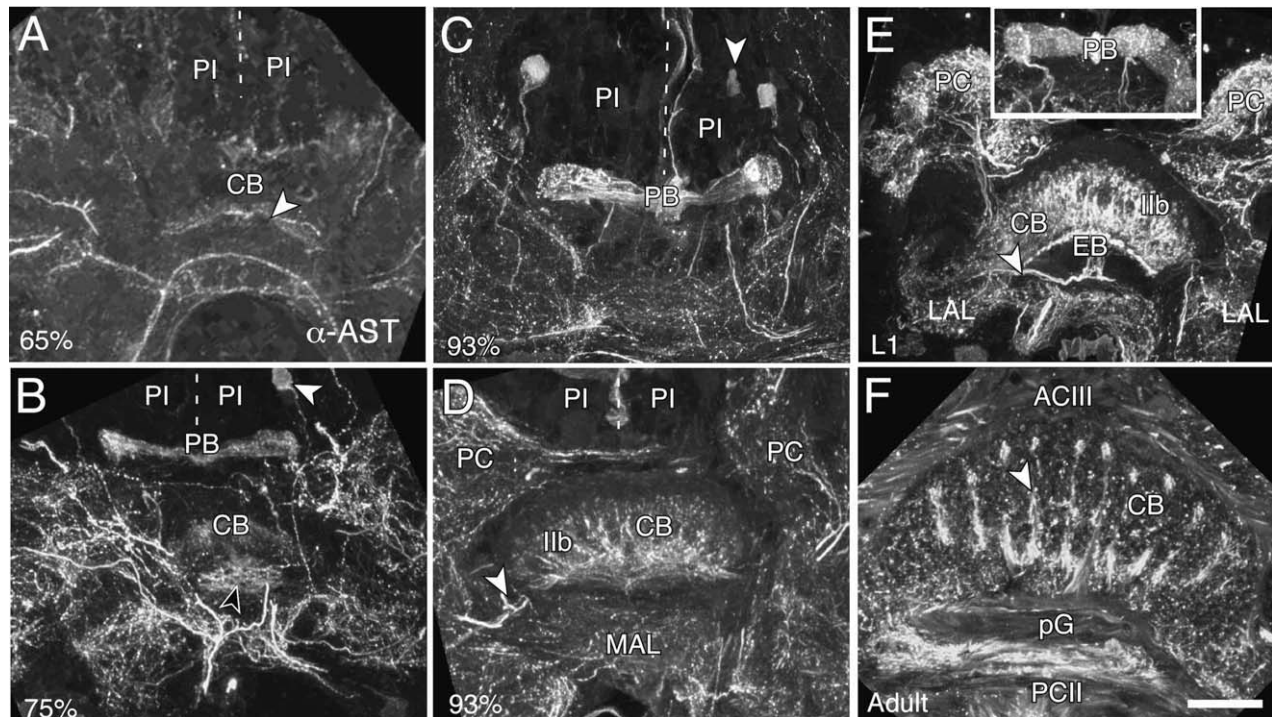


Fig. 3. Confocal images of brain slices reveal AST immunoreactivity in the developing central complex (CX). **A:** 65% of embryogenesis. Tangential projections (white arrowhead) in the central body (CB) express AST. **B:** 75% of embryogenesis. Strong immunoreactivity is present in the tangential projection system (type IV) of the protocerebral bridge (PB), in type II, III tangential projection neurons, and columnar neurons (white arrowhead) of the PI. CB contains richly braided terminals and several tangential crossing fibers (black arrowhead). **C:** 93% of embryogenesis. Columnar projection neurons (white arrowhead) show AST immunoreactivity, as do tangential fibers in the PB. **D:** 93% of embryogenesis but more ventral than in "C." Characteristic type II tangential projections in the isthmus tract (white arrowhead) and in layer IIb of CB. **E:** First postembryonic instar (L1). The type II tangential projection expands in layer IIb of the CB and in the anterior strip of the EB. Immunoreactivity is present in the isthmus tract (white arrowhead) between LAL and CB. Inset shows strong immunoreactivity in the PB at this stage. **F:** Adult. Strongly immunoreactive columnar projections (white arrowhead) in the CB. ACIII, third anterior commissure; PCII, second posterior commissure; pG, posterior groove. Scale bar represents 25 μ m in A, 30 μ m in B, 40 μ m in C, D, and 60 μ m in E, F.

reactivity in the PB (Fig. 3A). After 70%, further Allatostatin immunoreactive tangential projections appear in the CX. Allatostatin immunoreactive fibers form extensive arborizations in the CB (Fig. 3B) and strong immunoreactivity in the PB, but not in the columnar w, x, y, and z tracts, indicating that these PB projections belong to type IV tangential projection neurons (c.f. Vitzthum et al., 1996). The AST immunoreactive horizontal fibers branching off in layers Ib and IIb are consistent with those of AST 3 neurons described by Vitzthum et al. (1996). Immunoreactivity in the PB but without staining of PI neurons or fibers of w, x, y, and z tracts suggests that the AST 4 neurons are involved and express AST at this stage. Cell bodies associated with these projections are located dorsolaterally of the bridge. It was possible to identify the AST 2 projection system because of its characteristic pathway in the isthmus tract, the fusion of the left and right tracts before their projection to layer IIB of the CB, as well as their expansion anteriorly via the columnar system. From 80% onward (e.g., 93% in Fig. 3C,D), all four AST tangential projection systems are visible, as

are the columnar neurons and their processes in the PB, the w, x, y, and z tracts, the noduli, and the ALs. On the basis of the distribution of the immunoreactive staining in CB layers Ia and Ib, we suggest that the ASC 2 neurons are the first to express AST in the columnar system. During further development, additional immunostaining could be detected in the MAL and in branches of the CB, indicating AST expression in the columnar ASC 1 neurons. The density of the AST immunoreactive arborizations increases so that the AST immunoreactive pattern in the CX of first instars (Fig. 3E) is essentially the same as in the adult (Fig. 3F).

Periviscerokinin/Pyrokinin Immunoreactivity

The pattern of PVK and PK immunoreactivity has not been described for the adult locust brain; however, members of these peptide families were identified in the PI and retrocerebral complex of *L. migratoria* and *S. gregaria* via mass spectrometry (Clynen et al., 2003a,b).

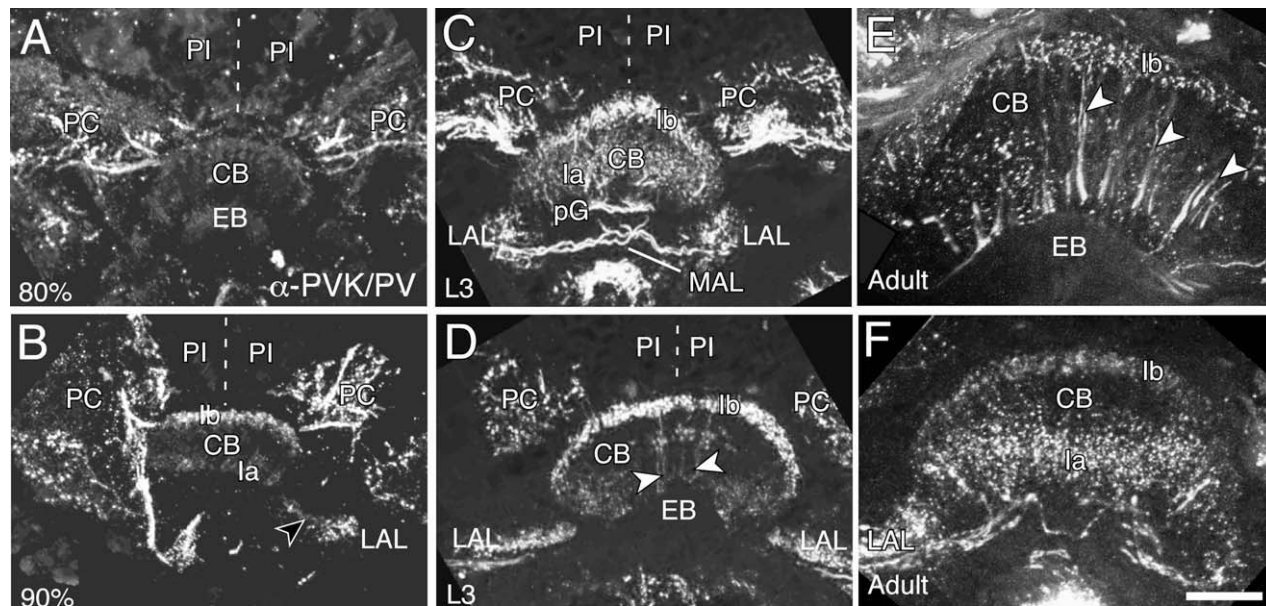


Fig. 4. Confocal images of brain sections reveal PVK/PK immunoreactivity during development. **A:** 80% of embryogenesis. Immunoreactivity is present in unidentified fibers of the PC, but the CX is free of staining. **B:** 90% of embryogenesis. Immunoreactivity is present in the LALs (black arrowhead) and in layers Ia,b of the CB. **C:** Postembryonic third instar (L3). Immunoreactivity is present in layers Ia,b of the CB, in the posterior groove (pG), in the LALs and MAL. The immunoreactive pattern is adult like. **D:** Postembryonic third instar but more ventral than "C." Columnar projections (white arrowheads) and layer Ib of the CB are immunoreactive, as are the LALs. **E:** Adult. Columnar projections (white arrowheads) of the CB are immunoreactive, as is layer Ib. **F:** Adult, but more ventral than in "E." Layers Ia,b of the CB are immunoreactive. Scale bar represents 30 μ m in A, 35 μ m in B, and 60 μ m in C–F.

As described above, our antiserum stains both PVKs and PKs. During development, PVK/PK immunoreactivity in the CX could only be detected relatively late in the embryo (90%); however, strong PVK/PK staining could be seen earlier (80%) in the lateral protocerebrum and in the neurosecretory pathways (Fig. 4A). A PVK/PK immunoreactive signal was first seen at 90% in a cell group projecting via the LAL into CB layer Ib (Fig. 4B). Arborizations of a second PVK/PK immunoreactive cell group were subsequently detected at the third instar stage (Fig. 4C,D). The PVK/PK staining pattern at this stage is adult like.

In the adult, we only found PVK/PK immunoreactivity in the tangential system of the adult CX. Rich PVK/PK immunoreactive ramifications were seen in the LALs and in all CB layers. Columns of the ascending tangential system of the CB also showed immunoreactivity. Two immunoreactive cell groups located in the inferior protocerebrum project axons through the LALs into the CB. The first group projects via the ipsilateral LALs into layer Ib of the CB, and the second group projects through the ipsilateral LAL into the contralateral LAL and into the CB. Staining was absent in the columnar PI neurons, in PB fibers, in the EB, and in the noduli (Fig. 4E,F).

FLRFamide-Like Immunoreactivity

In the adult CX, FLRFamide-like peptides are expressed primarily in tangential projection neu-

rons. These neurons project into the accessory lobes and then via the isthmus tract into the EB and CB layer I (Homberg et al., 1999). FLRFamide-like immunoreactivity in the CX could first be detected only relatively late during embryogenesis (80%, Fig. 5A), whereas other cerebral regions show intensive FLRFamide-like immunoreactivity already at 65% of embryogenesis (not shown). At 90% (Fig. 5B), immunoreactivity in the CX is obvious in fibers of the LALs and MAL, whereas in the CB and EB it is still extremely weak (at the limit of detectability; Fig. 5B). In the first instar (Fig. 5C), weak staining is present in tangential fibers, which follow columnar tracts of the CB and EB. The pattern is almost identical to that of the adult and becomes stronger during subsequent instars (not shown).

Developmental Pattern of Serotonin (5HT) Immunoreactivity in the CX

Serotonin immunoreactivity has been extensively described in the CX of adult *Schistocerca* by Homberg (1991). Here, several serotonergic small field neurons (S1 cells) of the PI project via the PB and the columnar w, x, y, and z tracts into CB layer III and to the noduli to form the columnar serotonergic system. The other five large field neuron pairs/groups constitute the tangential serotonergic projection system of the CX. The S2 cells project to the PB and the posterior optic

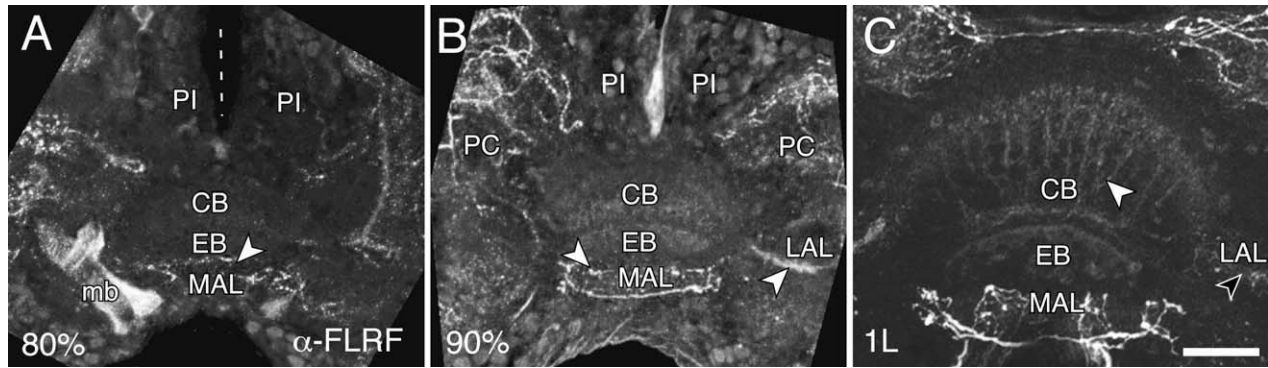


Fig. 5. Confocal images of brain slices reveal developing FLRFamide-like immunoreactivity in the CX. **A:** 80% of embryogenesis. Some immunoreactivity is present in the MAL (white arrowhead) and neighboring mushroom body (mb), but not in the CB or EB. **B:** 90% of embryogenesis. Immunoreactivity is present in tangential projections (white arrowheads) of the MAL and LAL, whereas in the CB and EB it is still extremely weak. **C:** Postembryonic first instar. Weak immunoreactivity is present in the tangential system (white arrowhead) of the CB, in the LAL (black arrowhead), and MAL. mb, mushroom body. Scale bar represents 50 μ m.

tubercles. The S3 neurons of the inferior protocerebrum run through the LAL and the isthmus tract into layer Ia of the CB. The S4 neuron pair in the frontomedian protocerebrum gives rise to varicose branches in layer Ib of the CB. The S5 neuron pair in the posterior PI innervates the CB layer Ia, and the S6 pair projects into the contralateral LALs where their terminals arborize extensively.

In the embryo, appreciable serotonin immunoreactivity appears in the CX only after 75% of development but then intensifies significantly during further development. At the 80% stage (Fig. 6A), tangential projection neurons (the future S2–S6 group) begin to express serotonin and allow their projections to the PB (S2) and via the LALs into the CB (S5) to be visualized immunohistochemically. Serotonergic fibers can also be seen throughout the whole CB, indicating serotonin is present in the S3, 4, and 6 adult equivalent groups. The staining pattern also indicates that serotonin appears simultaneously in all serotonergic tangential projection neurons of the CX (those known as S2–S6 in the adult), whereas no serotonin immunoreactivity could as yet be detected in the columnar w, x, y, and z tracts and in PI neurons (Fig. 8A). In the late embryo (90–95%; Fig. 6B,C), the staining intensity is definitely greater in the tangential projection neurons and fibers; otherwise, the pattern is very similar to that of the preceding stage. Any differences appear to derive from the expansion of the neuropilar volume of the CX as a result of increasing fiber density during this developmental period (see Boyan et al., 2008b). The serotonin immunoreactivity in the columnar system can be first detected shortly before hatching (Fig. 6D). The serotonin staining pattern in the 99% embryo (Fig. 6D) is very similar to that of the L1 (Fig. 6E,F) and adult (Fig. G–I) stages, but the full complement of S1 immunoreactive cells (~60 cells after Homberg, 1991) is not evident yet.

Colocalization of Serotonin With Neuropeptides in the CX

We investigated whether serotonin colocalized with neuropeptides in central complex neuropils during development. Our double labeling experiments (Fig. 7) show that at least up to the third larval instar stage, serotonin is not coexpressed with LomTK (Fig. 7A), AST (Fig. 7B), PVK/PK (Fig. 7C), or FLRFamide (Fig. 7D) in either the tangential or columnar projection systems. This lack of coexpression is consistent with the clearly distinct layering we observe in the developing CB neuropil (layers Ib, III), for example.

Developmental Pattern of NO (NADPH-Diaphorase)

A detailed analysis of NO (NADPHd) activity in the adult grasshopper brain has been provided by Kurylas et al. (2005). Six neuron types (about 170 neurons) with tangential, pontine, and columnar projection systems in the CX were identified. Stained fibers could be detected in all parts of the CX. The processes of about 50 neurons in the posterior PI contribute to the columnar NO system. The main fibers of these neurons run to the PB and then via the w, x, y, and z tracts into layer III of the CB and further to the noduli. The single pair neurons of the first tangential system (TL1) are located in the ventromedian protocerebrum. Their neurites ramify in the LTs of the LALs and enter the EB via the isthmus tract. The second tangential neuron group (TL2) is localized in the median protocerebrum. Their neurites have a similar projection as the TL1, but they enter the EB more ventrally. The third tangential neuron group has arborization fields in the posterior optic tubercle and in the PB. Their somata (about 20) are localized posteriorly to the PB. The fourth tangential neuron group is composed of six bilateral pairs

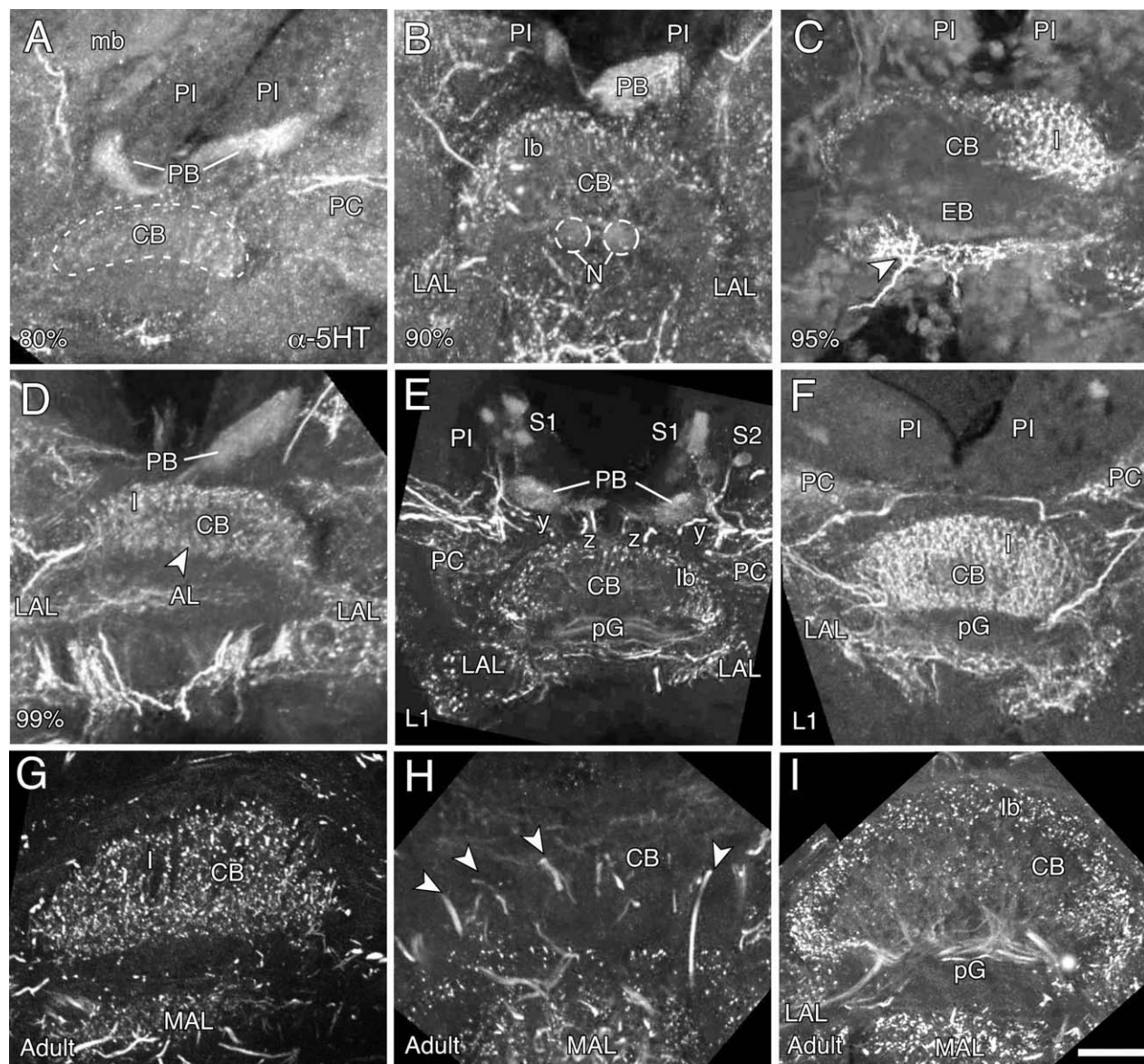


Fig. 6. Confocal images of brain slices reveal developing serotonin (5HT) immunoreactivity in the CX. **A:** 80% of embryogenesis. Immunoreactivity is present in tangential neurons with projections in the PB and CB (outlined, dashed white). **B:** 90% of embryogenesis. Immunoreactivity is present in the PB, in layer Ib of the CB, and the LALs. Noduli (outlined, dashed white) are not stained. **C:** 95% of embryogenesis. Immunoreactivity is stronger in layer I of the CB and in tangential projections (white arrowhead) in the isthmus tract (IT) posterior to the EB. **D:** 99% of embryogenesis. Immunoreactivity is widespread in layer I and in columnar projections (white arrowhead) of the CB, in the LALs, the anterior lip (AL), and the PB. **E:** Postembryonic first instar (L1). Strong staining could be detected in the S1,S2 columnar systems of the PI, in the w, x, y, and z tracts, in layer Ib of the CB, in tangential fibers of the posterior groove (pG), and in the bilateral LALs. **F:** Postembryonic first instar at another depth to that in preparation "E." Strong staining is present in layer I of the CB and in tangential fibers involving the LALs. **G:** Adult. Extensive staining throughout layer I of CB and the MAL. **H:** Adult. Clear immunoreactivity in S1 columnar neurons (white arrowheads) within the CB. **I:** Adult. Immunoreactivity in layer Ib of the CB, in the pG, the LAL, and the MAL. AL, anterior lip. Scale bar represents 40 μ m in A–C, 50 μ m in D–F, 35 μ m in B, and 60 μ m in G–I.

of neurons, which run along the w tract to the LALs. Terminal arborizations are also found in layer II of the CB. The fifth tangential arborization system is localized in posterior commissure I, in layer II of the CB, and in the anterior lip. The somata of the latter two tangential neuron groups have yet to be located. The pontine neuron groups (45 somata in the anterior PI) contribute to the

columns of layer I and layer IIb in the CB. These neurons interconnect the columns of these layers.

Developmental expression of NO as revealed by diaphorase (NADPHd) staining in the CX is described in Figure 8. NADPHd activity first appears at 70% of embryogenesis in the pontine projection system within the CB, in the isthmus tracts of the TL1 tangential system, the LALs, and

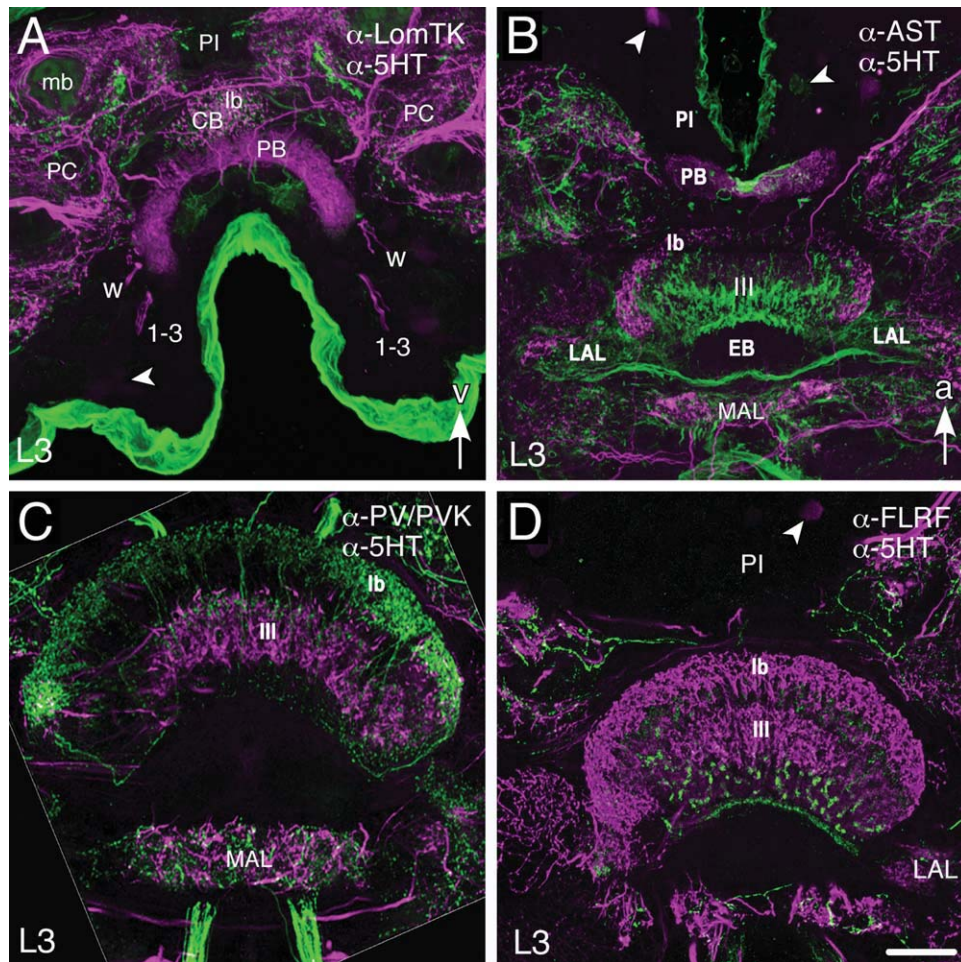


Fig. 7. Confocal images of brain slices (postembryonic instar 3, L3) following double immunostaining of serotonin (5HT, magenta throughout) with (A) LomTK (green), (B) AST (green), (C) Locusta PK/PVK (green), and (D) FLRFamide (green). Serotonin does not colocalize to these peptides in arborizations or somata (white arrowheads in B,D) of the CX (or PC) during development resulting in a clear layering of the arborizations in Ib, III of the CB. Arrow indicates ventral (v) in "A" and anterior (a) in "B–D." 1–3, projections from cell cluster 1–3 (white arrowhead in A) of the PI. Scale bar represents 70 μ m in A, 50 μ m in B, 75 μ m in C, and 70 μ m in D.

in cell body clusters in the PI and PC, which do not contribute to the CX (Fig. 8A). At 73% (Fig. 8B), staining is present in layer IIb of the CB (consistent with the cells belonging to the pontine system), in the EB, in the LAL, the isthmus tract of the tangential system, and fine fibers from this system are present in the posterior groove (ventral groove of Kurylas et al., 2005). At 75% (Fig. 8C), NADPHd activity appears in columnar neurons in the PI, in the PB, in the columnar y and z tracts, in layer III of the CB, expands via the isthmus tracts to the TL2 tangential system, and in the posterior groove. The staining pattern at 80% (Fig. 8D) represents a continuation of the pattern above, but the staining is now more intense in NADPHd-positive cell bodies of the PI and in their projections in the CB. Note also that all elements of the columnar system making up layer III of the CB are active equally, and simultaneously, there is no lateral to medial gradation in signal strength. During the next develop-

mental period (85%, Fig. 8E–H), the staining in the w, x, y, and z columnar system, in layer III of the CB, in the EB, in the isthmus tract intensifies further and resembles that of the adult (not shown, but see Kurylas et al., 2005). Cells belonging to discrete z, y, and x lineages are identifiable (Fig. 8G) and contribute dense arborizations to layer III of the CB via the w, x, y, and z tracts (Fig. 8H). Staining could also be detected in the noduli (Fig. 8E,H).

Because the NADPH staining pattern we report for the CX here matches the anti-NOS signaling found by Kurylas et al. (2005), we suggest that our data indirectly reveal the development of NO signaling.

DISCUSSION

Developmental and Spatial Patterns of Immunoreactivity

In this study, we demonstrate that members of the LomTK-, AST-, FLRFamide-, and PVK/PK-

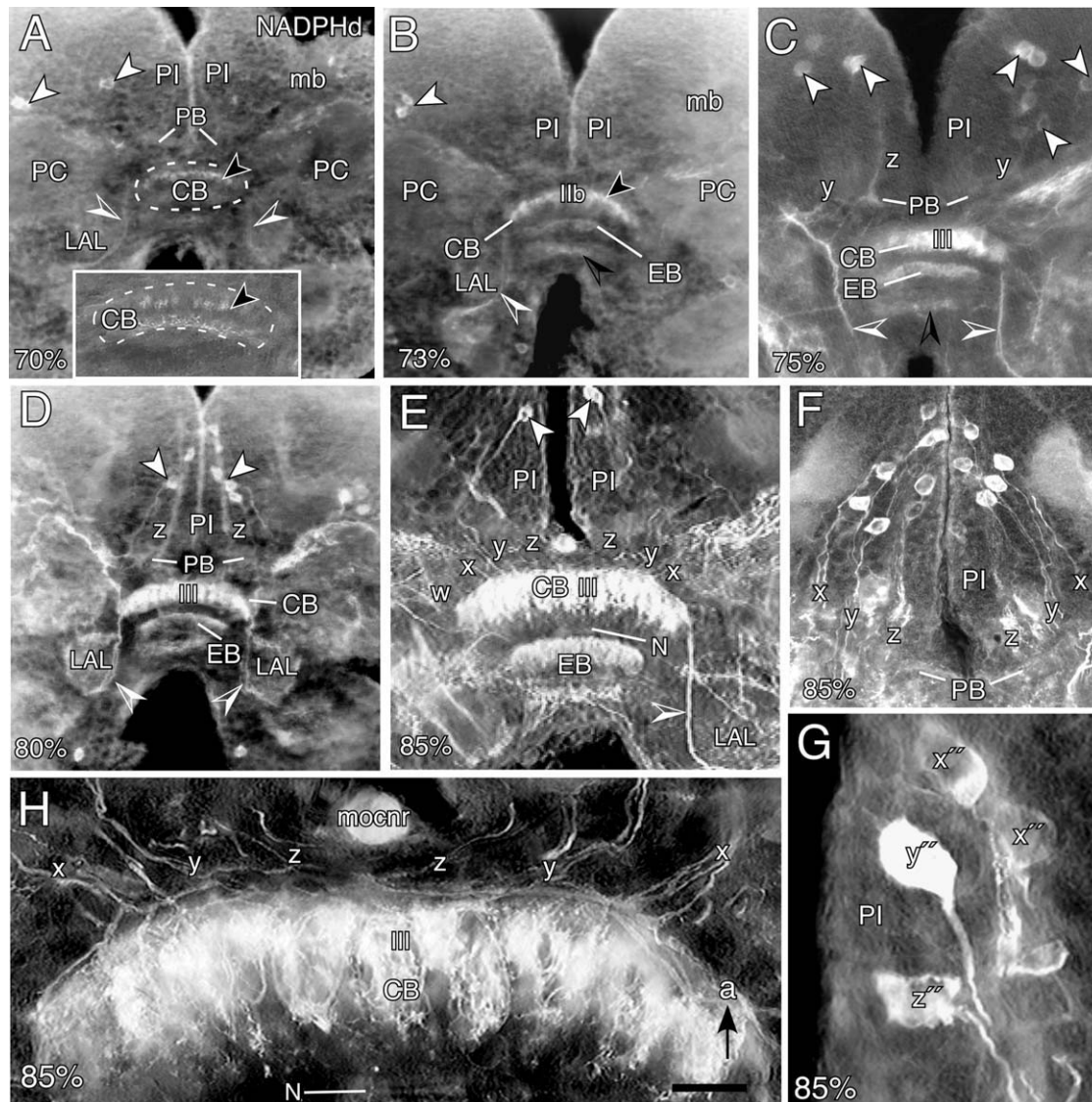


Fig. 8. Photomicrographs of brain slices reveal developmental expression of NO (as revealed by NADPH-diaphorase staining) in the CX. Images have been color inverted for effect. **A:** 70% of embryogenesis. NADPHd activity is present in the pontine projection system (black arrowhead) within the CB (outline dashed white), in the isthmus tracts (white/open arrowheads) of the tangential system, the LALs, and in cell body clusters (white arrowheads) in the PI and PC, which do not contribute to the CX. Inset shows magnified view of pontine projections in the CB (outlined, dashed white). **B:** 73% of embryogenesis. Staining is present in layer IIb of the CB, in the EB, in the LAL, in the isthmus tract (white/open arrowhead) of the tangential system, and in the posterior groove (black/open arrowhead). **C:** 75% of embryogenesis. NADPHd activity appears in columnar neurons in the PI (white arrowheads), in the PB, in the columnar y and z tracts, in layer III of the CB, and expands in the isthmus tracts (white/open arrowheads) and in the MAL (black/open arrowhead). **D:** 80% of embryogenesis. Staining pattern is as at 75%, but signal is stronger as more cells in clusters of the PI (white arrowheads) generate NO. **E:** 85% of embryogenesis. Staining in the w, x, y, and z columnar system (PB not shown), in layer III of the CB, in the EB, and in the isthmus tract (white/open arrowhead) intensifies further and resembles that of the adult (not shown). **F:** 85% of embryogenesis. NADPHd-positive somata belonging to discrete z (z'), y (y'), and x (x') lineages in the PI. These cells contribute dense arborizations to layer III of the CB via the w, x, y, and z tracts (**H**). Arrow in H indicates anterior (a) for all panels. mocnr, median ocellar nerve root. Scale bar in H represents 112 μ m in A, 45 μ m in inset to A, 75 μ m in B,C, 63 μ m in D, 50 μ m in E, 35 μ m in F, 10 μ m G, and 16 μ m in H.

neuropeptide families, the monoamine serotonin, and the gaseous messenger NO are all expressed in the embryonic central complex (CX) according to a substance-specific temporal pattern. The use of MALDI-IMS (Fig. 1) enabled a precise identification of individual peptides present in the CX to

be made for the first time. Because no specific antibodies against individual peptides exist, standard immunocytochemical studies must use antibodies that recognize amino acid sequences common to families of peptides, but cannot, for example, reveal which specific tachykinin is

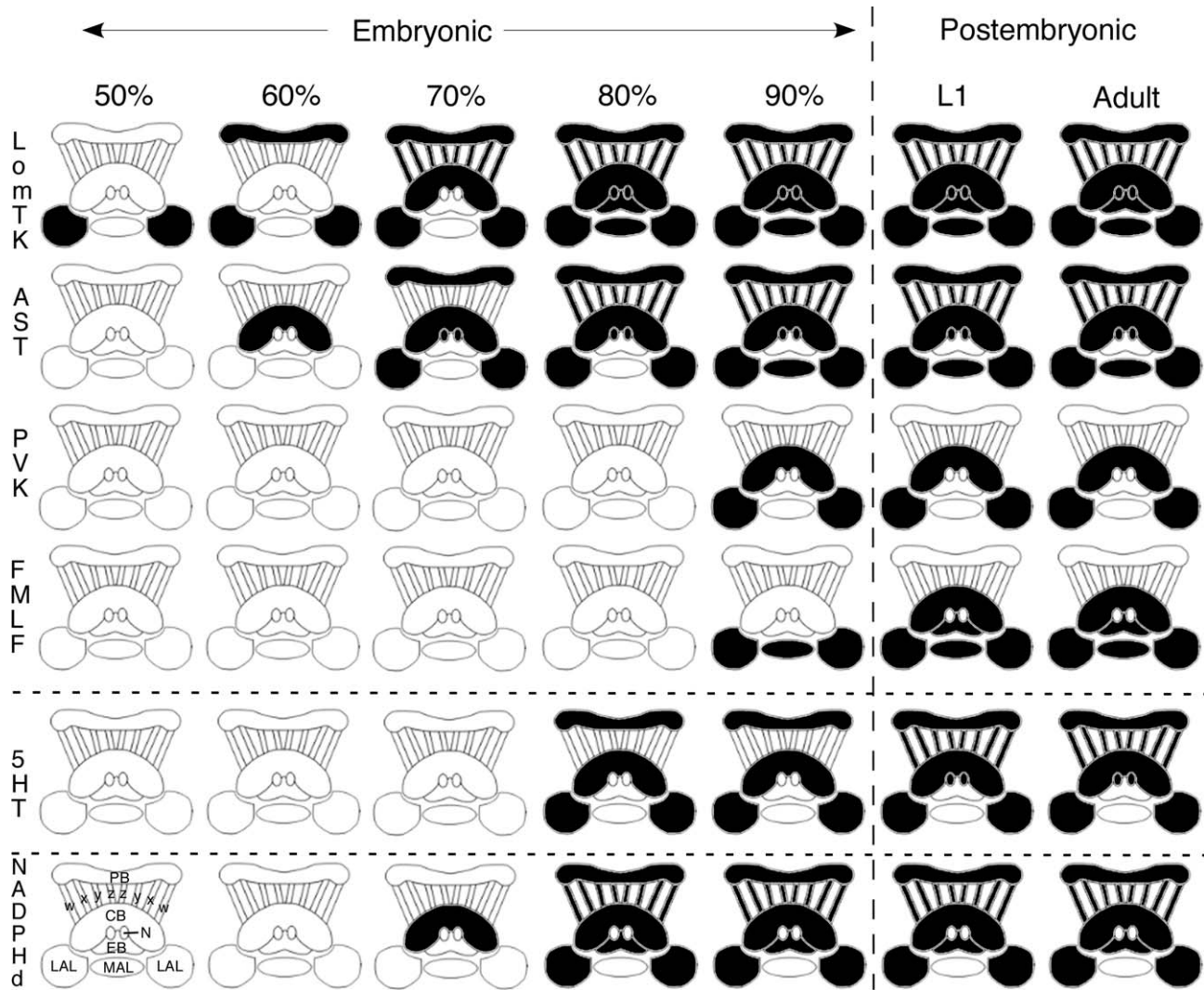


Fig. 9. Schematic (not to scale) summarizes expression of neuromodulators in the central complex during embryonic and postembryonic development. Hatching is represented by the vertical dashed line. Black indicates the presence of immunoreactivity. Neuromodulators are grouped according to whether they are peptides (LomTK, AST, PVK/PK, and FLRFamide), a classical transmitter (5HT), or the synthesizing enzyme (NADPHd) for the endogenous messenger (NO). Modules of the CX are shown in outline and represent as labeled at bottom left: PB, protocerebral bridge; w,x,y,z, tracts; CB, central body; N, noduli; EB, ellipsoid body; LAL, lateral accessory lobe; MAL, median accessory lobe.

present within the CX. The MALDI-IMS technique can do this, and, in combination with standard immunohistochemistry, offers the possibility of generating a biochemical "fingerprint" of the central complex at any given stage of development. This biochemical architecture can, in turn, be compared with the known neuroarchitecture for a given stage with the aim of increasing our understanding of the functional aspects of central complex, and brain, development.

If we consider the overall developmental pattern of the CX as summarized in Figure 9, then several consistent features stand out irrespective of the neuromodulator examined. First, for some neuromodulators (e.g., 5HT), specific modules of the CX (noduli, w, x, y, and z tracts) only become immunoreactive af-

ter hatching, whereas others (e.g., LomTK, AST, and NO) appear to have completed their developmental plan during embryogenesis. Combined with this, and also obvious from our data (e.g., Fig. 2, LomTK), is the fact that immunoreactivity does not appear in an all-or-nothing manner during development. There is a clear stepwise increase in signal strength for each neuromodulator, suggesting that the proportion of immunoreactive cells, and not just their arborization, increases progressively during development. This has significant implications. All the neuroblasts generating the neurons of the central complex undergo apoptosis between 70 and 80% of embryogenesis (Boyan et al., 2010; Williams et al., 2005), which means that the central complex of an hemimetabolous insect such as the grasshopper is structurally complete at

hatching. Biochemically, however, this is obviously not the case. The brain neurons expressing the neuromodulators we have tested are all born during embryogenesis but then remain biochemically dormant for varying periods. As recently demonstrated for single identified central complex lineages, this dormant period is stereotypic for each neuromodulator and can last for over 40% of embryogenesis (Boyan et al., 2010). The stepwise increase in immunoreactive signal strength is therefore not a reflection of an increase in absolute cell number, but in the proportion of cells from the population that express the relevant neuromodulator.

Second, if we consider individual neuropilar modules of the CX, then immunoreactivity appears very early in the LALs and/or the CB and only later in the PB and w, x, y, and z tracts. This suggests that where a neuromodulator is expressed in all these modules, its tangential components are immunoreactive before its columnar components. This may have a functional origin as the two system components have their origins in different parts of the brain. The columnar neurons are located principally in the PI (Vitzthum et al., 1996; Vitzthum and Homberg, 1998; Homberg, 2002) some having outputs to thoracic motor centers via the VNC and the others to the retrocerebral complex via the NCC nerves (see Burrows, 1996). The tangential neurons, on the other hand, link the accessory lobes with the anterior optic tubercles and the VNC, are part of the pathway for polarized vision, and play a role in visual pattern recognition and spatial orientation (Träger et al., 2008). It may be that such information enters the central complex first via the tangential system and is then passed on to the columnar system for premotor processing, in which case neuromodulators may need to be active in the developing tangential system first. The immunoreactive pattern in the developing CX therefore allows us to extrapolate to a more general developmental pattern and functional interpretation of neuromodulator activation in the brain and VNC.

Third, our data (Fig. 9) show that some neuropeptides (LomTK, 50%; AST, 60%) are expressed earlier than the classical transmitter serotonin (80%) or the NO-synthesizing enzyme diaphorase (70%). If we focus on just the columnar system, we observe a similar pattern: LomTK-related peptides are the first neuroactive substances to appear (70%), followed by diaphorase (NO) at 75%, and AST at 80%. Serotonin immunoreactivity could be first seen in columnar neurons of newly hatched instars, whereas PVK/PKs and FLRFamide are not expressed in the columnar projection system at all.

Functional Aspects of Neuromodulator Expression

Developing neuronal networks have been shown to be active before the appearance of the adult

behaviors in both invertebrates (Stevenson and Kutsch, 1986) and vertebrates (Feller, 1999; Moody and Bosma, 2005). Any functional interpretation of the developmental role of specific neuromodulators must be made with caution because neuromodulators can have different physiological effects in the embryonic nervous system than in the adult, and receptors can be expressed before some of the neuromodulatory substances themselves are present in the circuit (Rehm et al., 2008).

The Neuropeptides

Tachykinins. In the past, successful localization of neuropeptides to specific regions of the insect brain using mass spectroscopy was technically difficult (Eckert et al., 2002; Predel et al., 2003; Neupert et al., 2007, 2009; Neupert and Predel, 2010). In the case of the tachykinin family of peptides, for example, Nässel and Winther (2002) first produced distinct antisera against several (not all) isoforms in the cockroach brain to map their neuronal distribution. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry now allows us to localize distinct members of neuropeptide families to identified brain regions such as the CX to a resolution of 50 μm in a simple, fast, reproducible way. We were thus able to demonstrate that both *Lom*-tachykinin I and *Lom*-tachykinin II members of the tachykinin family are expressed in the adult CX (Fig. 1). Both of these peptides have been previously shown to be present in the nervous tissue of *Schistocerca* (Schoofs et al., 1997). Expression of LomTK peptides in the columnar system of the CB at 70% of embryogenesis coincides with the time window during which these columnar projections are themselves being established (Boyan et al., 2008a,b). LomTKs have a variety of effects in physiological and pathological events (as neurohormone, neuromodulator, and neurotransmitter), which may vary substantially depending on the activation of different receptor subtypes (see Severini et al., 2002). A relatively early expression of tachykinins has been reported for a range of embryonic nervous systems (Kim et al., 1998; Nässel et al., 2002; Antle et al., 2005), and there is some evidence that members of the tachykinin family can act as neurotrophic factors (Satake et al., 2003; Catalani et al., 2006), for example, in the development of respiratory networks (Wong-Riley and Liu, 2005).

Allatostatin. Our biochemical analysis reveals three members of the AST peptide family to be present in the locust CX: *Scg*-allatostatin-1, -4, and -10. All these peptides, termed schistostatins, have been previously identified in the *Schistocerca* brain (Schoofs et al., 1998). These peptides are also pleiotropic in function. As neurohormones they inhibit juvenile hormone synthesis by the corpora allata, while as inhibitory substances they are also involved in the modulation of muscle

contraction and the maturation of neural circuits (Rankin et al., 1998; Dirksen et al., 1999; Kreissl et al., 1999). Although a specific role for ASTs in the development of the CX has yet to be demonstrated, it is conceivable that they play a role in the maturation of synaptic pathways associated with locomotion and song production.

Periviscerokinin (Lom-PVK1-2, Scg-PVK-3) and pyrokinin (Scg-PK1-7). A mass spectrometric analysis of neurohemal organs and of the CNS has previously demonstrated the presence of several members of both the periviscerokinin (Lom-PVK1-2, Scg-PVK-3) and the pyrokinin (Scg-PK1-7) families in *S. gregaria* (Clynen et al., 2003a,b); however, the distribution of periviscerokinin- or pyrokinin-positive fibers has not been previously reported for the grasshopper brain. We show via mass spectrometry that members of both the pyrokinins (Scg-PK1 and -3) and the periviscerokinins (Lom-PVK-1, Scg-PVK-3) are expressed in the CX (Fig. 1) and via immunohistochemistry that PVK/PK peptides are present in the tangential, but not the columnar, projections of the CX (Fig. 4). These peptides appear relatively late (90%) in the CX, and the immunoreactive pattern resembles that of the adult only at the third instar stage. Periviscerokinins and pyrokinins are the major neuroactive components of the neurosecretory organs of the abdominal ganglia and are also present in interneurons of the CNS (such as the columnar neurons in the cockroach CX system) in several insect species (Eckert et al., 1999). Although effects on neurogenesis or neuronal differentiation are not known, they are known to have myomodulatory and diuretic effects (Predel and Wegener, 2006), so that their postembryonic appearance could conceivably be associated with the transition from a yolk to a vegetative diet after hatching.

FLRFamide. FLRFamide immunoreactivity appears in tangential projections of the CX relatively late during embryonic development, and an expression pattern like that of the adult only appears in postembryonic instars (Fig. 9). Scg-FLRF was previously identified in the *Schistocerca* brain (Robb et al., 1989), and our MALDI-IMS analysis demonstrates that Scg-FLRFamide is expressed in the central complex. As a neurohormone, *Schistocerca* FLRFamide is released by the CC-CA system and regulates the heartbeat, influences the contraction of leg muscles (Robb et al., 1989; Robb and Evans, 1990), and has myoinhibitory effect on the locust oviduct (Peeff et al., 1994). These functions are clearly associated with postembryonic developmental stages, consistent with the immunoreactive pattern we see.

A Classical Transmitter

5HT (serotonin). In arthropods, the biogenic amine serotonin plays a role in odor-dependent

behaviors (Kloppenburger et al., 1999) and is thought to influence developmental processes such as neurogenesis, axogenesis, and cellular differentiation (Condrón, 1999; Richards et al., 2003; Sykes and Condrón, 2005; Stern et al., 2007). In the central complex, serotonin appears first (75–80%) in tangential projections in a manner similar to that of members of LomTK and AST families. The presence of immunoreactive fibers in the LALs, isthmus tract, in the CB, and in the PB (Fig. 7) suggests that tangential neurons S2–S6 of the CX simultaneously express serotonin up to this point in embryonic development (c.f. Homberg, 1991 for adults). The serotonin immunoreactive columnar cells in the PI and the columnar tracts by contrast only develop immunoreactivity shortly before hatching (Figs. 7 and 9).

Although serotonin has been considered to function as a general coordinator of biochemical differentiation and neuronal function (Gaspar et al., 2003), the late serotonin immunoreactivity we observe compared with the other neuromodulators we tested precludes such interactions, at least with most of the neuropeptidergic systems we have analyzed in the developing CX system. Our colocalization studies reveal no coexpression of serotonin with other neuromodulators either during embryogenesis (Boyan et al., 2010) or during larval stages (Fig. 7), consistent with their representing different neurochemical projection systems in the CX. This situation may change in the adult, and it is of course possible that these systems converge downstream at a premotor output level. Indeed, serotonin has been shown to be involved in the control of both skeletal and visceral muscle activity in the adult insect (see Roeder, 2002).

A Signal Molecule

The endogenous messenger NO. The roles of NO in adult and developing nervous systems of both vertebrates and invertebrates are legion (see Bicker, 1998, 2001; Kiss and Vizi, 2001). Nevertheless, a survey of the literature reveals just a single reference to NADPHd activity in the central complex of the embryonic grasshopper (Seidel and Bicker, 2002). This study reports NADPHd activity in the central complex at 70% of embryogenesis as being “striking” (cit. p.73), but unfortunately no anatomical description of the staining pattern is given.

Our data (Fig. 8) confirm that NADPHd activity in the CX first appears at 70% of embryogenesis in pontine neurons. The signal is then found in the tangential system (TL1, TL2) of the LALs and EB and subsequently (75%) in the columnar system. Although NADPHd activity in the TL1 and TL2 tangential systems increases in a stepwise manner, perhaps as more fibers innervate the region, that in the columnar system appears abruptly and

simultaneously in all its elements. If we assume that NADPHd activity is related to the presence of NO, our data suggest a temporally coordinated activation of NO in this particular pathway. NO has been linked to cell proliferation (Kuzin et al., 1996), patterning (Gibbs and Truman, 1998), axogenesis (Seidel and Bicker, 2000), and neuronal maturation and synaptogenesis (Truman et al., 1996a,b; Ball and Truman, 1998) in developing insect nervous systems. It is clear that all these processes are also involved in establishing the neuroarchitecture of the central complex, so it is no surprise that this molecule is strongly expressed here too. Insights into its role in specific aspects of central complex development must be the focus of future studies.

In sum, our data are consistent with previous reports of neuropeptide, monoamine, and endogenous messenger molecules in embryonic insects in both the brain (Romeuf and Rémy, 1984; Westbrook and Bollenbacher, 1990; Wegerhoff et al., 1996; Bicker, 1998, 2001; Seidel and Bicker, 2002) and VNC (Goodman et al., 1979; Keshishian and O'Shea, 1985; Eckert et al., 2002; Lee et al., 2008). It is apparent from our study that neuroactive substances are expressed in the embryonic central complex of *S. gregaria* coincidentally with the establishment of its characteristic chiasmal columnar organization (Boyan et al., 2008a,b). A causal role for these neuroactive substances in the establishment of the mature CX awaits confirmation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Karin Fischer and Ulrike Reich for excellent technical assistance.

LITERATURE CITED

- Antle MC, LeSauter J, Silver R. 2005. Neurogenesis and ontogeny of specific cell phenotypes within the hamster suprachiasmatic nucleus. *Dev Brain Res* 157:8–18.
- Ball EE, Truman JW. 1998. Developing grasshopper neurons show variable levels of guanylyl cyclase activity on arrival at their targets. *J Comp Neurol* 394:1–13.
- Bentley D, Keshishian H, Shankland M, Toroian-Raymond A. 1979. Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. *J Embryol Exp Morphol* 54:47–74.
- Bicker G. 1998. NO news from insect brains. *Trends Neurosci* 21:349–355.
- Bicker G. 2001. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res* 303:137–146.
- Boyan GS, Williams JDL. 1997. Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. *Dev Genes Evol* 207:317–329.
- Boyan GS, Williams JL, Herbert Z. 2008a. An ontogenetic analysis of locust tachykinin-like expression in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 37:480–491.
- Boyan GS, Williams JL, Herbert Z. 2008b. Fascicle switching generates a chiasmal neuroarchitecture in the embryonic central body of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthropod Struct Dev* 37:539–544.
- Boyan G, Williams L, Herbert Z. 2010. Multipotent neuroblasts generate a biochemical neuroarchitecture in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 340:13–28.
- Burrows M. 1996. *The Neurobiology of an Insect Brain*. Oxford: Oxford University Press.
- Catalani E, Dal Monte M, Gangitano C, Lucattelli M, Fineschi S, Bosco L, Bagnoli P, Casini G. 2006. Expression of substance P, neurokinin 1 receptors (NK1) and neurokinin 3 receptors in the developing mouse retina and in the retina of NK1 knockout mice. *Neuroscience* 138:487–499.
- Clynen E, Huybrechts J, De Loof A, Schoofs L. 2003a. Mass spectrometric analysis of the perisymphatic organs in locusts: Identification of novel periviscerokinins. *Biochem Biophys Res Commun* 300:422–428.
- Clynen E, Baggerman G, Huybrechts J, Vanden Bosch L, De Loof A, Schoofs L. 2003b. Peptidomics of the locust corpora allata: Identification of novel pyrokinins (-FXPRLamides). *Peptides* 24:1493–1500.
- Clynen E, Husson SJ, Schoofs L. 2009. Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci* 1163:60–74.
- Condron BG. 1999. Serotonergic neurons transiently require a midline-derived FGF signal. *Neuron* 24:531–540.
- Dirksen H, Skiebe P, Abel B, Agricola H, Buchner K, Muren JE, Nässel DR. 1999. Structure, distribution, and biological activity of novel members of the allatostatin family in the crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 20:695–712.
- Eckert M, Predel R, Gundel M. 1999. Periviscerokinins-like immunoreactivity in the nervous system of the American cockroach. *Cell Tissue Res* 295:159–170.
- Eckert M, Herbert Z, Pollák E, Molnár L, Predel R. 2002. Identical cellular distribution of all abundant neuropeptides in the major abdominal neurohemal system of an insect (*Periplaneta americana*). *J Comp Neurol* 452:264–275.
- Feller MB. 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22:653–656.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. 2003. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4:1002–1012.
- Gibbs SM, Truman JW. 1998. Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* 20:83–93.
- Goodman CS, O'Shea M, McCaman R, Spitzer NC. 1979. Embryonic development of identified neurons: Temporal pattern of morphological and biochemical differentiation. *Science* 204:1219–1222.
- Hanesch U, Fischbach KF, Heisenberg M. 1989. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 257:343–366.
- Heinrich R. 2002. Impact of descending brain neurons on the control of stridulation, walking, and flight in orthoptera. *Microsc Res Tech* 56:292–301.
- Heinze S, Homberg U. 2007. Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. *Science* 315:995–997.
- Heinze S, Homberg U. 2008. Neuroarchitecture of the central complex of the desert locust: Intrinsic and columnar neurons. *J Comp Neurol* 511:454–478.
- Homberg U. 1991. Neuroarchitecture of the central complex in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* and *S. americana* as revealed by serotonin immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 303:245–254.
- Homberg U. 2002. Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microsc Res Tech* 56:189–209.
- Homberg U, Vitzthum H, Müller M, Binkle U. 1999. Immunocytochemistry of GABA in the central complex of the locust *Schistocerca gregaria*: Identification of immunoreactive neurons and colocalization with neuropeptides. *J Comp Neurol* 409:495–507.
- Huber F. 1960. Untersuchungen über die Funktion des Zentralnervensystems und insbesondere des Gehirns bei der Fortbe-

- wegung und der Lauterzeugung der Grillen. Z Vgl Physiol 44:60–132.
- Ilius M, Wolf R, Heisenberg M. 1994. The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: Studies on mutants and mosaics of the gene *ellipsoid body open*. J Neurogenet 9:189–206.
- Keshishian H, O'Shea M. 1985. The acquisition and expression of a peptidergic phenotype in the grasshopper embryo. J Neurosci 5:1005–1015.
- Kim MY, Lee BH, Kwon D, Kang H, Nassel DR. 1998. Distribution of tachykinin-related neuropeptide in the developing central nervous system of the moth *Spodoptera litura*. Cell Tissue Res 294:351–365.
- Kiss JP, Vizi ES. 2001. Nitric oxide: A novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. Trends Neurosci 24:211–215.
- Kloppenborg P, Ferns D, Mercer AR. 1999. Serotonin enhances central olfactory neuron responses to female sex pheromone in the male sphinx moth *Manduca sexta*. J Neurosci 19:8172–8181.
- Kreissl S, Weiss T, Djokaj S, Balezina O, Rathmayer W. 1999. Allatostatin modulates skeletal muscle performance in crustaceans through pre- and postsynaptic effects. Eur J Neurosci 11:2519–2530.
- Kurylas AE, Ott SR, Schachtner J, Elphick MR, Williams L, Homberg U. 2005. Localization of nitric oxide synthase in the central complex and surrounding midbrain neuropils of the locust *Schistocerca gregaria*. J Comp Neurol 484:206–223.
- Kuzin B, Roberts I, Peunova N, Enikolopov G. 1996. Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. Cell 87:639–649.
- Lee G, Kim KM, Kikuno K, Wang Z, Choi YJ, Park JH. 2008. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide *corazonin* in *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res 331:659–673.
- Mobbs PG. 1985. Brain structure. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, Vol. 5: Nervous System: Structure and Motor Function. Oxford: Pergamon. pp 299–370.
- Moody WJ, Bosma MM. 2005. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. Physiol Rev 85:883–941.
- Müller M, Homberg U, Kühn A. 1997. Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). Cell Tissue Res 288:159–176.
- Nassel DR. 1993. Insect myotropic peptides: Differential distribution of locust tachykinin and leucokinin-like immunoreactive neurons in the locust brain. Cell Tissue Res 274:27–40.
- Nassel DR. 1994. Neuropeptides, multifunctional messengers in the nervous system of insects. Verh Deutsch Zool Ges 87:59–81.
- Nassel DR. 1999. Tachykinin-related peptides in invertebrates: A review. Peptides 20:141–158.
- Nassel DR. 2002. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones. Prog Neurobiol 68:1–84.
- Nassel DR, Winther AM. 2002. Neuronal co-localization of different isoforms of tachykinin-related peptides (LemTRPs) in the cockroach brain. Cell Tissue Res 308:225–239.
- Nassel DR, Kim MY, Lundquist CT. 1995. Several forms of callitachykinins are distributed in the central nervous system and intestine of the blowfly *Calliphora vomitoria*. J Exp Biol 198:2527–2536.
- Nassel DR, Lundquist CT, Muren JE, Winther ÅME. 1998. An insect peptide family in search of functions: The tachykinin-related peptides. In: Coast GM, Webster SG, editors. Recent Advances in Arthropod Endocrinology. Cambridge: Cambridge University Press. pp 248–277.
- Neckameyer WS, Matsuo H. 2008. Distinct neural circuits reflect sex, sexual maturity, and reproductive status in response to stress in *Drosophila melanogaster*. Neuroscience 156:841–856.
- Neupert S, Predel R. 2010. Peptidomic analysis of single identified neurons. Methods Mol Biol 615:137–144.
- Neupert S, Johard HA, Nassel DR, Predel R. 2007. Single-cell peptidomics of *Drosophila melanogaster* neurons identified by Gal4-driven fluorescence. Anal Chem 79:3690–3694.
- Neupert S, Schattschneider S, Predel R. 2009. Allatotropin-related peptide in cockroaches: Identification via mass spectrometric analysis of single identified neurons. Peptides 30:489–494.
- Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R. 2008. Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. Nature 453:1244–1247.
- Peeff NM, Orchard I, Lange AB. 1994. Isolation, sequence, and bioactivity of PDVDHVFLRFamide and ADVGHVFLRFamide peptides from the locust central nervous system. Peptides 15:387–392.
- Popov AV, Sitnik NA, Savvateeva-Popova EV, Wolf R, Heisenberg M. 2003. The role of central parts of the brain in the control of sound production during courtship in *Drosophila melanogaster*. Neurosci Behav Physiol 33:53–65.
- Power ME. 1943. The brain of *Drosophila melanogaster*. J Morphol 72:517–559.
- Predel R, Wegener C. 2006. Biology of the CAPA peptides in insects. Cell Mol Life Sci 63:2477–2490.
- Predel R, Herbert Z, Eckert M. 2003. Neuropeptides in perisymphathetic organs of *Manduca sexta*: Specific composition and changes during the development. Peptides 24:1457–1464.
- Rankin SM, Stay B, Chan K, Jackson ES. 1998. Cockroach allatostatin-immunoreactive neurons and effects of cockroach allatostatin in earwigs. Arch Insect Biochem Physiol 38:155–165.
- Rehm KJ, Deeg KE, Marder E. 2008. Developmental regulation of neuromodulator function in the stomatogastric ganglion of the lobster, *Homarus americanus*. J Neurosci 28:9828–9839.
- Renn SCN, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH. 1999. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: Organization and development of the central complex. J Neurobiol 41:189–207.
- Richards KS, Simon DJ, Pulver SR, Beltz BS, Marder E. 2003. Serotonin in the developing stomatogastric system of the lobster, *Homarus americanus*. J Neurobiol 54:380–392.
- Robb S, Evans PD. 1990. FMRFamide-like peptides in the locust: Distribution, partial characterization and bioactivity. J Exp Biol 149:335–360.
- Robb S, Packman LC, Evans PD. 1989. Isolation, primary structure and bioactivity of SchistoFLRFamide, a FMRFamide-like neuropeptide from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Biochem Mol Res Commun 160:850–856.
- Roeder T. 2002. Biochemistry and molecular biology of receptors for biogenic amines in locusts. Microsc Res Tech 56:237–247.
- Romeuf M, Rémy C. 1984. Early immunohistochemical detection of somatostatin-like and methionine-enkephalin-like neuropeptides in the brain of the migratory locust embryo. Cell Tissue Res 236:289–292.
- Satake H, Kawada T, Nomoto K, Minakata H. 2003. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: A review. Zoolog Sci 20:533–549.
- Schoofs L, Veelaert D, Vanden Broeck J, De Loof A. 1997. Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. Peptides 18:145–156.
- Schoofs L, Janssen I, Veelaert D, Vanden Broeck J, Tobe SS, De Loof A. 1998. Ecdysiotatins and allatostatins in *Schistocerca gregaria*. Ann N Y Acad Sci 15:301–305.
- Seidel C, Bicker G. 1996. The developmental expression of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pupal honeybee. Tissue Cell 28:663–672.
- Seidel C, Bicker G. 2000. Nitric oxide and cGMP influence axogenesis of antennal pioneer neurons. Development 127:4541–4549.
- Seidel C, Bicker G. 2002. Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMP signaling pathways in the brain of the embryonic grasshopper. Dev Brain Res 138:71–79.

- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. 2002. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54:285–322.
- Stern M, Knipp S, Bicker G. 2007. Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). *J Comp Neurol* 501:38–51.
- Stevenson PA, Kutsch W. 1986. Basic circuitry of an adult-specific motor program completed with embryogenesis. *Naturwissenschaften* 73:741–743.
- Strausfeld NJ. 1976. *Atlas of an Insect Brain*. New York: Springer.
- Strauss R. 2002. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12:633–638.
- Strauss R, Heisenberg M. 1993. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 13:1852–1861.
- Sykes PA, Condrion BG. 2005. Development and sensitivity to serotonin of *Drosophila* serotonergic varicosities in the central nervous system. *Dev Biol* 286:207–216.
- Träger U, Wagner R, Bausenwein B, Homberg U. 2008. A novel type of microglomerular synaptic complex in the polarization vision pathway of the locust brain. *J Comp Neurol* 506:288–300.
- Truman JW, de Vente J, Ball EE. 1996a. Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. *Development* 122:3949–3958.
- Truman JW, Ewer J, Ball EE. 1996b. Dynamics of cyclic GMP levels in identified neurones during ecdysis behaviour in the locust *Locusta migratoria*. *J Exp Biol* 199:749–758.
- Vitzthum H, Homberg U. 1998. Immunocytochemical demonstration of locustatachykinin-related peptides in the central complex of the locust brain. *J Comp Neurol* 390:455–469.
- Vitzthum H, Homberg U, Agricola H. 1996. Distribution of Dipallatostatin I-like immunoreactivity in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* with detailed analysis of immunostaining in the central complex. *J Comp Neurol* 369:419–437.
- Wegerhoff R, Breidbach O. 1992. Structure and development of the larval central complex in a holometabolous insect, the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell Tissue Res* 268:341–358.
- Wegerhoff R, Breidbach O, Lobemeier M. 1996. Development of locustatachykinin immunopositive neurons in the central complex of the beetle *Tenebrio molitor*. *J Comp Neurol* 375:157–166.
- Weinrich A, Kunst M, Wirmer A, Holstein GR, Heinrich R. 2008. Suppression of grasshopper sound production by nitric oxide-releasing neurons of the central complex. *J Comp Physiol A* 194:763–776.
- Westbrook AL, Bollenbacher WE. 1990. The development of identified neurosecretory cells in the tobacco hornworm, *Man-duca sexta*. *Dev Biol* 140:291–299.
- Williams JLD. 1975. Anatomical studies of the insect central nervous system: A ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). *J Zool Lond* 176:67–86.
- Williams JL, Boyan GS. 2008. Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: Axons pioneering the w, x, y, z tracts project onto the primary commissural fascicle of the brain. *Arthropod Struct Dev* 37:129–40.
- Williams JLD, Güntner M, Boyan GS. 2005. Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: Temporal topology organizes the neuroarchitecture of the w, x, y, z tracts. *Arthropod Struct Dev* 34:97–110.
- Wong-Riley MT, Liu Q. 2005. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respir Physiol Neurobiol* 149:83–98.